

**DIE BEDEUTUNG DER FLAVONOLGLYKOSIDE FÜR
DIE RESORPTION VON I-HYOSCYAMIN**

Ein Beitrag zur Frage Galenikum oder Reinsubstanz

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**vorgelegt von
Erich Weil
aus Oppershofen**

Marburg/Lahn 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554411_0046

DIE BEDEUTUNG DER FLAVONOLGLYKOSIDE FÜR DIE RESORPTION VON I-HYOSCYAMIN

Ein Beitrag zur Frage Galenikum oder Reinsubstanz



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Erich Weil
aus Oppershofen

Marburg/Lahn 1967



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 14. Juni 1967

Tag der mündlichen Prüfung am 28.6.1967

Berichterstatter: Prof. Dr. P. H. List

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Schmid

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
Oktober 1964 bis April 1967 im Institut für
Pharmazeutische Technologie und im Institut
für Pharmakologie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. P.H. List

angefertigt, dem ich für die Anregung des
Themas und sein allzeit förderndes Interesse
herzlich danke.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. W. Schmid

für die fachliche Beratung, die technische
Unterstützung und die wohlwollende Förderung
meiner Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG	3
2. ALLGEMEINER TEIL	11 - 53
2.1. Biologische Wertbestimmung für 1-Hyoscyamin	12
2.1.1. Anordnung nach CUSHNY	12
2.1.2. Anordnung nach MAGNUS	13
2.1.3. Anordnung nach ROTHLIN	13
2.1.4. Anordnung nach PULEWKA	14
2.1.5. Anordnung nach WERNER	14
2.1.5.1. Gehaltsbestimmung von Bella- donna-Extrakten nach dem Mono- graphie-Entwurf für das DAB 7-BRD	15
2.2. Kontinuierliche, photometrische Messung der 1-Hyoscyaminresorption	19
2.3. Kolorimetrische Bestimmung kleiner 1-Hyoscyaminmengen mit Indikatorfarb- stoffen	22
2.3.1. Verfahren nach CRONHEIM und WARE	22
2.3.2. Verfahren nach EL DARAWAY et al.	23
2.3.3. Verfahren nach HÄUSSLER	23
2.3.3.1. Eichkurve mit bekannten 1-Hyos- cyamin-Konzentrationen	23
2.4. Resorptionsversuche am überlebenden Rattendünndarm	24
2.4.1. 1-Hyoscyamin-Resorption aus 0,025% 1-Hyoscyaminlösung	26
2.4.2. 1-Hyoscyamin-Resorption aus Nativ-Frischblatt-Extraktlösung	26
2.4.3. 1-Hyoscyamin-Resorption aus einer Lösung handelsüblichen Wurzelextraktes	28
2.4.3.1. Eigenschaften und Wirkungen der Gerbstoffe	28
2.4.3.2. Bestimmung des Gerbstoffgehalts in Belladonna-Extrakten	30
2.4.4. 1-Hyoscyamin-Resorption aus "gerbstofffreier" Wurzelextrakt- lösung	31

2.4.5. 1-Hyoscyamin-Resorption aus Lösungen von 0,25% Tannin und 1-Hyoscyamin	32
2.4.6. 1-Hyoscyamin-Resorption aus Lösungen von 0,50% Tannin und 1-Hyoscyamin	32
2.4.7. 1-Hyoscyamin-Resorption aus DAB 6-Blattextraktlösung	33
2.4.7.1. Isolierung der genuinen Fla- vonoltriglykoside aus Bella- donna-Blattextrakten	36
2.4.8. 1-Hyoscyamin-Resorption aus 0,125-0,250%igen Flavonoltri- glykosidlösungen und 1-Hyos- cyamin	38
2.4.9. 1-Hyoscyamin-Resorption aus 0,025%igen Flavonoltriglykosid- lösungen und 1-Hyoscyamin	38
2.4.10. 1-Hyoscyamin-Resorption aus kalt gesättigter Rutinlösung und 1-Hyoscyamin	43
2.4.11. 1-Hyoscyamin-Resorption aus 0,025%igen Quercetinlösungen und 1-Hyoscyamin	44
2.4.12. 1-Hyoscyamin-Resorption aus 0,125%igen Quercetinammonium- salz-Lösungen und 1-Hyoscyamin	45
2.5. Enzymaktivität im Nativ-Frischblatt- Extrakt	46
2.5.1. 1-Hyoscyamin-Resorption aus 0,125%igen Flavonoltriglyko- sidlösungen und 1-Hyoscyamin unter Zusatz von β -Glucosidase	48
2.5.2. 1-Hyoscyamin-Resorption aus DAB 6-Blattextrakt-Lösungen unter Zusatz von β -Glucosidase	50
2.6. Gehaltsbestimmung der Flavonolgly- koside nach CHRIST und MÜLLER	52
3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	54
4. ZUSAMMENFASSUNG	57
5. EXPERIMENTELLER TEIL	58 - 68

	Seite
5.1. Bestimmung des Alkaloidgehalts in Belladonna-Extrakten nach dem Mono- graphie-Entwurf zum DAB 7-BRD	59
5.2. Tyrodelösung	60
5.3. Vorbereitung des isolierten Ratten- dünndarms	60
5.4. Gehaltsbestimmung nach HÄUSSLER	61
5.5. Lösungstyrode für Nativ-Frischblatt- Extrakt	62
5.6. Nativ-Frischblatt-Extrakt-Infusions- lösung	62
5.7. Lösungstyrode für handelsüblichen Wurzelextrakt	62
5.8. Wurzelextrakt-Infusionslösung	62
5.9. Hautpulvermethode nach SCHRÖDER	63
5.10. Kupferacetatmethode nach LINDE und TEUFER	63
5.11. Gerbstoffbestimmung mit $PbCl_2$ -Lösung	64
5.12. Wurzelextrakt "gerbstofffrei"-Infu- sionslösung	64
5.13. Lösungstyrode für Wurzelextrakt "gerbstofffrei"	65
5.14. DAB 6-Blattextrakt-Infusionslösung	65
5.15. Lösungstyrode für den DAB 6-Blattextrakt	65
5.16. Isolierung der Flavonoltriglykoside A + B	65
5.16.1. Reindarstellung der Flavonol- triglykoside A + B	66
5.17. Herstellung der Cellulose-Schicht- Platten	66
5.18. Quantitative Bestimmung der Flavonol- triglykoside nach CHRIST und MÜLLER)	66
5.19. Statistische Berechnungen	68
5.20. Berechnungen der Blut-Isotonie	68
6. LITERATURVERZEICHNIS	69
LEBENS LAUF	69

1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Das Deutsche Arzneibuch (DAB 6 und das vorbereitete DAB 7-BRD), als die für den Arzneimittelhersteller verbindliche Vorschriftensammlung führt eine Reihe pflanzlicher Auszüge (Extracta fluida, spissa, sicca).

Gerade heute, wo das synthetische Pharmakon die Therapie beherrscht, stellt sich die Frage nach dem therapeutischen Wert einer galenischen Zubereitung.

Häufig wird, wenn das wirksame Prinzip eines Galenikums bekannt und damit synthetisch zugänglich geworden, dennoch das Galenikum der exakt dosierbaren Reinsubstanz vorgezogen. Man vermutet eine gegenüber dem analytisch reinen Wirkstoff veränderte, ergänzende Wirkung durch unbekannte Nebenwirkstoffe oder Begleitstoffe, die den Weg des Pharmakons zum Erfolgsorgan günstig beeinflussen.

In der Fachliteratur finden sich allerdings nur sehr spärlich Aussagen, in denen das Problem experimentell behandelt wurde. Mutmaßend beziehen sich verschiedene Autoren (1) auf wirkungsbegünstigende Faktoren einer galenischen Zubereitung wie Begleit- und Ballaststoffe, die auch als "Koeffektoren" in die Literatur Eingang gefunden haben. Nur von wenigen der zahlreich verwendeten Galenika sind die Wirkstoffe soweit bekannt, dass sie isoliert und bestimmt werden können. Neben ihnen liegen viele, nur teilweise chemisch identifizierte und pharmakologisch geprüfte Begleitstoffe vor. Über den positiven oder negativen Einfluss dieser Begleitsubstanzen auf das physiologische Verhalten des Wirkstoffes lassen nur Experimente im jeweiligen speziellen Fall Aussagen zu, d.h. man wird nicht nur jede Droge für sich, sondern auch jede daraus gewonnene Arzneiform bei verschiedenen Applikationsarten zu vergleichen haben.

Das Ergebnis einer solchen Untersuchung lässt noch keinen Schluss zu, welcher der Begleitstoffe als "Ko-

effektor" und welcher als indifferenten Ballaststoff zu bezeichnen sei. Solange aber diese Frage offen ist, darf bei der Arzneibereitung möglichst kein Drogeninhaltsstoff als Ballaststoff beseitigt werden.

Daraus geht die ungeheure Kompliziertheit des Grundproblems der galenischen Zubereitung hervor.

Bei allen begründeten Vorbehalten, die heute den galenischen Arzneiformen gegenüber gemacht werden, hat Extractum Belladonnae in praktisch allen Arzneibüchern unserer Zeit seinen Platz behalten. Das liegt einerseits daran, dass seine stark wirksamen Alkaloide bekannt und bestimmbar sind. Praktisch handelt es sich um 1-Hyoscyamin (2) und wenig Nebenalkaloide (3).

Andererseits wird gerade dieser Extrakt wegen seiner auf Erfahrung begründeten, zunächst nur ungenügend erwiesenen "besseren" Wirkung wegen häufig dem reinen Alkaloid vorgezogen.

ROTHLIN (4) spricht von einer klinischen Erfahrungstatsache, dass ein guter Belladonna-Extrakt dem Atropin in der therapeutischen Wirkung überlegen sei und findet eine Erklärung für das Phänomen. Er hatte Bellafofin, den Gesamtalkaloid-Auszug aus Folia Belladonnae gegenüber dem Reinalkaloid Atropin getestet und die Hälfte der Bellafofin-Dosis als Wirkungsäquivalent der Atropin-Dosis gefunden.

Mit der Überlegung, dass im lege artis hergestellten Belladonna-Extrakt fast nur 1-Hyoscyamin vorliegt (2), hingegen im Atropin das Razemat des d,l-Hyoscyamins mit bestenfalls der halben physiologischen Wirkung, findet seine Aussage eine plausible Erklärung.

LAUBENDER und BALLMAIER (5) kommentieren das Thema mit dem Erfolg, einmal das Galenikum, zum anderenmal die Reinsubstanz als wirksamer beurteilen zu können.

SCHLEMMER (6) stellt die unterschiedliche Wirksamkeit von Extrakten fest und fordert eine Klärung der Sachlage.

Atropin - oder d,l-Hyoscyamin - und seine Derivate zählen zur Gruppe der Parasympatholytica, deren periphere Wirkungen denen von Acetylcholin, Muscarin, Nicotin und Pilocarpin entgegengesetzt sind. Diese allgemeine Wirkungsweise erstreckt sich auf alle autonom innervierten Organe ("periphere Wirkung"). Infolge einer kompetitiven Verdrängung des Überträgerstoffes Acetylcholin in den peripheren Synapsen wirkt das l-Hyoscyamin als Antagonist der parasympathischen Erregung.

Folgende Wirkungen seien angeführt:

- Auge: Infolge Lähmung des Musculus sphincter pupillae und des Musculus ciliaris Akkommodationslähmung.
- Drüsen: Hemmung der Speichelsekretion, damit Trockenheit im Munde, Hemmung der Magen- und Schweißsekretion.
- Kreislauf: Nur bei hohen Dosen völlige Hemmung der Vagusfunktion am Herzen mit Pulsfrequenzen bis zu 150/Min. Starke Erweiterung der Hautgefäße, dadurch blühende, scharlachrote Hautfarbe (Symptome der Tollkirschenvergiftung).
- Bronchialtrakt: Erschlaffung der Bronchialmuskulatur, besonders bei spastischen Kontraktionszuständen wie Asthma bronchiale (Räucherstäbchen, -pulver, -tabletten).
- Verdauungstrakt: Keine Beeinflussung der Darmperistaltik von therapeutischen Dosen, kaum Relaxierung der Darmmuskulatur, dagegen als Spasmolyticum auf Pylorus und Cardia.
- Weiterhin wirkt Atropin bei Ureter- und Gallenwegspasmen und auf die quergestreifte Muskulatur.
- Bei Intoxikationen mit den als Cholinesterasehemmer wirksamen Polyalkylphosphaten (z.B. Parathion) werden sehr hohe Atropin-Dosen mit Erfolg eingesetzt.

Nach Vorschrift des DAB 6, des DAB 7-BRD und ausländischen Pharmakopöen sind zur Extraktbereitung Belladonnablätter zu verwenden. Eine zusätzliche Vorschrift über einen Wurzelextrakt gibt USP XV: Belladonna root fluidextrakt. PANEGROSSI (7) und v. WITZLEBEN (8) verwendeten nach Bekanntwerden einer Abkochung bulgarischer Belladonna-Wurzeln des einheimischen Heilkundigen RAEFF einen Wurzelextrakt bei Enzephalitikern.

Eine pharmakologische Beurteilung des Wirkungsunterschiedes oder der Äquivalenz beider Drogen steht noch aus.

KÜSSNER (3) und KREITMAIR (9) unterzogen Belladonna-Wurzeln aus verschiedenen Ursprungsländern einer analytischen und pharmakologischen Prüfung, um die Pharmakodynamik der Droge aufzuklären. Bemerkenswert ist, dass nach den Autoren neben den im Atropa-Blatt-Extrakt vorkommenden Alkaloiden 1-Hyoscyamin, Apoatropin und Belladonnin Scopolamin lediglich in der bulgarischen Wurzel Droge aufgefunden werden konnte.

Die physiologischen Einwirkungen und Angriffspunkte der genannten Alkaloide unterscheiden sich sehr wesentlich voneinander, im besonderen Hinblick auf Stärke und Toxizität:

Abb. 1 veranschaulicht, dass die pharmakologische Wirkung, aufgezeigt an einer Reihe von Kriterien, bei den Belladonna-Alkaloiden fast gegenläufig ist. Die günstige Beeinflussbarkeit verschiedener Symptome ist nach KREITMAIR (9) durch das Zusammenwirken dieser Alkaloide mit ihren grundsätzlich verschiedenen Angriffspunkten zur Erklärung für eine etwaige Überlegenheit von Belladonna-Extrakten heranzuziehen. Bei dem überwiegenden 1-Hyoscyamin-Anteil im Extrakt (etwa 98%) muss diese Hypothese angezweifelt werden. Daneben ist vor allem an eine Beeinflussung der Resorption der Alkaloide durch die Begleitstoffe zu denken.

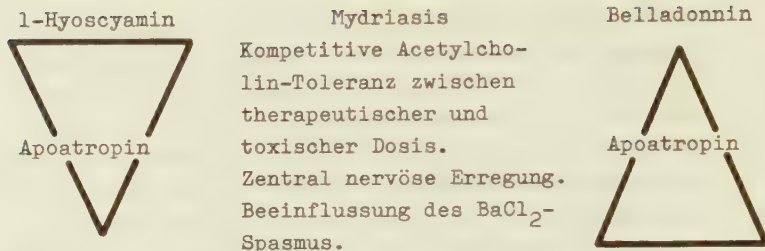


Abb. 1: Physiologisches Verhalten der Wurzel-Alkaloide (frei nach Kreitmair).

KREITMAIR (9) beschreibt als erster die unterschiedliche Resorptionsrate der genannten Alkaloide, worunter die Wirkstoffmenge verstanden wird, die in einer bestimmten, gemessenen Zeiteinheit in die Lipoidphase übergetreten ist (10) (11).

Pflanzenextrakte werden zumeist peroral verabreicht; somit gelangen die Inhaltsstoffe nach Resorption durch den Magen-Darm-Trakt an die Erfolgsorgane. Die derzeitigen Ansichten über den Resorptionsvorgang stimmen dahingehend überein, dass der enteral zu resorbierende Stoff in wässriger Phase gelöst sein muß. Schwer- oder unlösliche Stoffe werden der Resorption zugänglich gemacht durch Vergrößerung ihrer Oberfläche, oder hydrotropisch eingeschleust, was von der Dispersität der Teilchen abhängt (Emulsionen, Suspensionen, kolloide Lösungen). Hydrotrope Agentien im Darm sind Gallensäuren und fettsaure Salze.

Neutrale, undissoziiierbare Pharmaka, z.B. Alkohol, können im gesamten Magen-Darm-Trakt resorbiert werden, obgleich der Magen sonst nur im geringen Maße zur Resorption befähigt ist. Die Arbeitsgruppe um BRODIE (12) (13) (14) konnte experimentell sichern, dass die enterale Resorptionsrate mit steigender Lipoidlöslichkeit, entsprechend steigendem Verteilungs-

koeffizienten Öl/Wasser des Pharmakons zunimmt. Dies legt nahe, die Darmwand funktionell als lipoide Membran zu betrachten. DETTLI und SPRING (15) bezeichnen sie als "Lipoidsieb".

Offenbar sind für den Resorptionsvorgang und für die Fähigkeit eines Partikels, die lebende Membran zu durchdringen, nicht nur dessen Löslichkeit und Lipophilie von Bedeutung. Vielmehr stellen die Poren in einer Membran eine Möglichkeit für die Permeation dar.

Hydrophile, lipoidunlösliche Stoffe mit kleinem Molekulargewicht und Ionen können die hydrophobe Mucosamembran nicht passieren. Sie werden "interzellulär" durch wasserführende Poren in der funktionellen Barriere der Darmwand geschleust. Dieser Mechanismus besitzt, verglichen mit dem lipoiden Resorptionsvorgang, eine wesentlich geringere Leistung. Der durch die Versuche von TRAVELL (16) und SCHANKER (13) experimentell bestätigte Penetrationsvorgang entspricht der "non-ionic diffusion", einer Penetration schwacher Elektrolyte in Form Undissoziierter Moleküle durch Membranen von MILNE, SCRIBNER und CRAWFORD (17), die die Diffusion in Abhängigkeit von pH und pK diskutierten.

Für eine weitere transzelluläre Passage hat sich der Terminus "Membranvesikulation" eingeführt. STAUBESAND (18) beschreibt die Bildung von Bläschen durch Abschnürung aus dem Plasmalemma, die inerte Feststoffe einschliessen und sie durch Membranen schleusen, um sie an der Zellbasis wieder freizusetzen. Zwischen Phagozytose, Pinozytose (cell drinking) und Mikropinozytose besteht offenbar nur ein gradueller Unterschied.

Im Hinblick auf die vorausgehend beschriebenen Resorptionsmöglichkeiten wird verständlich, dass die Resorptionsgeschwindigkeit unlöslicher Stoffe durch die Wahl der Teilchengröße erheblich beeinflusst werden kann.

Werden schwerlösliche Säuren, z.B. Barbiturate, peroral appliziert, so ist der erzielbare Blutspiegel niedriger als bei Verabreichung ihrer wasserlöslichen Salze. Diese können zwar nicht als solche resorbiert werden; sie werden im sauren Milieu des Magens hydrolysiert, wodurch die freien Säuren in feinsten Zerteilung ausfallen, somit rasch resorbiert werden und einen hohen Blutspiegel ergeben.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Biologische Wertbestimmungen für l-Hyoscyamin

Es stellt sich die Frage, wie weit die Begleitstoffe eines Extraktes die physiologische Reaktion der Hauptwirkstoffe beeinflussen. Generell wird dieses Problem wohl nie beantwortet werden können. Ob und wie die Begleitstoffe eines Belladonna-Extraktes auf dem Weg des l-Hyoscyamins nach Verabreichung im Organismus eingreifen, muss geklärt werden.

Da, wie gesagt, ein Pflanzenextrakt meist peroral appliziert wird, ist zu prüfen, ob eine Beeinflussung schon beim Resorptionsvorgang einsetzt, sei es, dass Begleitstoffe beschleunigen oder hemmen.

In der Literatur wird häufig von biologischen Wertbestimmungen physiologisch wirksamer Substanzen berichtet.

2.1.1.

In einer Abhandlung von CUSHNY (19) wurden verschiedene Bestimmungsmöglichkeiten in vivo auf ihre Brauchbarkeit für die Untersuchung von Belladonna-Alkaloiden geprüft. Zu nennen sind: Die Wirkung auf die Pupille (Mydriasis), die Beschleunigung des Herzschlags durch Vagushemmung und die Hemmung der durch Pilocarpin angeregten Speichelsekretion mittels einer Speichelfistel. Bei diesen Versuchsmethoden wird ein operativer Eingriff am Versuchstier, - CUSHNY arbeitete an der nicht narkotisierten Katze, - vermieden.

Die Versuchsergebnisse sind jedoch stark von dem Erregungszustand des Tieres abhängig. Bei dem Versuch mit einer Speichelfistel ist durch Anwendung von Pilocarpin als Antagonisten eine neue Größe in Rechnung zu setzen, die die Auswertung der Resultate kompliziert. Die genannten Methoden haben wegen der langsamen Elimination der Alkaloide alle den Nachteil, dass man am selben Tier die in ihrer Wirkung zu vergleichenden Zubereitungen in kurzer Zeit nicht miteinander vergleichen kann.

Neben den genannten in-vivo-Methoden wird häufig der überlebende Dünndarm zur quantitativen Bestimmung der Belladonna-Alkaloide benutzt. Versuchsanordnungen wurden beschrieben von MAGNUS (20), NEUKIRCH (21), TRENDLENBURG (22) u.a.

2.1.2.

In eigenen Versuchen wurden in der Anordnung nach MAGNUS sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt, wobei größere Amplituden nach mehrmaligem Wechsel der Bad-Tyrodellösung oder nach längerem Stehen des Präparates registriert wurden. Die Untersuchungen von LE HEUX (23) (24) könnten eine Erklärung für die schwankenden Werte geben.

LE HEUX bewies, dass die 1-Hyoscyamin-Wirkung abhängig ist von dem jeweiligen Gehalt des Darmes oder der Bad-Tyrodellösung an Cholin, das vom Darm selbst abgegeben wird.

1-Hyoscyamin wirkt als Cholin-Antagonist. Die jeweiligen Konzentrationen beider Stoffe sind für eine überwiegende Wirkung des einen oder anderen verantwortlich. Kleine 1-Hyoscyamindosen hemmen, während größere Dosen durch Verdrängung des Cholins eine erregende Wirkung auf die multipolaren Ganglienzellen des Auerbachschen Plexus haben und so die Darmperistaltik aktivieren. Obgleich die Möglichkeit besteht, mit demselben Darmpräparat mehrere Versuche zu machen, können diese, wie vorausgehend begründet, nur bedingt miteinander verglichen werden.

2.1.3.

ROTHLIN (25) nutzt als meßbaren Effekt die Blutdrucksenkung nach elektrischer Vagusreizung und ermittelt eine durchschnittliche Wirkungs-dosis von 0,01-0,0001 mg Atropinsulfat/kg beim Kaninchen. Der Autor konnte kei-

ne bestimmte Grenzdosis festlegen, da das Abbauvermögen bei Kaninchen sehr verschieden ist.

2.1.4.

Aufgrund der mydriatischen Wirkung des 1-Hyoscyamins, Atropins und Scopolamins benutzte PULEWKA (26) (27) das Auge der weissen Maus zu quantitativen Aussagen über Zubereitungen, die diese Pharmaka enthalten. Bei enteraler und parenteraler Applikation tritt Mydriasis auf, wobei der jeweilige Pupillendurchmesser bis zu einem gewissen Grad ein Maß für die verabreichte Dosis darstellt. Sichere Aussagen gewinnt man nur, wenn das winzige Mäuseauge mit Hilfe eines Mikrometers unter dem einfachen Mikroskop beobachtet wird. PULEWKA gibt einen für biologische Verhältnisse sehr guten mittleren Fehler von $\pm 5-8\%$ an. Dieser hingegen wird nur erreicht, wenn man von grossen Tierkollektiven ausgeht.

2.1.5.

Da auch Katzen und Kaninchen für derartige Untersuchungen in der Literatur genannt werden, schien das Kaninchenauge wegen des viel größeren Pupillendurchmessers das günstigere Testobjekt.

Durch Arbeiten von zuerst FLEISCHMANN (28) et al., dann WERNER (29) wurde festgestellt, dass etwa zwei Drittel aller Haus- und Wildkaninchen im Besitze einer 1-Hyoscyamin-acyl-Hydrolase sind und deshalb 1-Hyoscyamin innerhalb weniger Stunden in Tropin und Tropasäure hydrolysieren, d.h. physiologisch unwirksam machen können. Bei der weissen Maus, der weissen Ratte, dem Menschen verläuft wegen der fehlenden Hydrolase die Eliminierung von Tropanalkaloiden nur sehr langsam. Nur so lässt sich die Dauer einer Mydriasis von 8-12 Tagen erklären.

Nach WERNER (29) werden die 1-hyoscyamin-acyl-hydrolase-aktiven Tiere leicht von denen unterschieden, die

nicht im Besitz des Fermentes sind, indem man in den Konjunktivalsack des Kaninchenauges eine Dosis von 0,001 mg 1-Hyoscyaminsulfat in 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung eintropft. Bei ferment-inaktiven Tieren erweitert sich die Pupille nach wenigen Minuten, während bei ferment-aktiven Tieren keine Mydriasis festgestellt werden kann.

2.1.5.1.

Um vergleichende Aussagen über die Resorptionsrate von Reinalkaloid 1-Hyoscyamin und verschiedener Industrieextrakte machen zu können, mußte der Alkaloidgehalt der einzelnen galenischen Zubereitungen bekannt sein. Die Pharmakopöen lassen den Gehalt an Gesamt-Alkaloiden nach Freisetzen der Basen und unterschiedlichen Reinigungsschritten acidimetrisch bestimmen.

Bedingt durch die Vielzahl der Manipulationen erhält man nach den einzelnen Alkaloid-Bestimmungsvorschriften unterschiedliche Gehalte.

In den nachfolgenden aufgeführten Zubereitungen wurde nach dem Monographie-Entwurf für das DAB 7-BRD der Gesamtalkaloidgehalt bestimmt:

- a) Handelsüblicher Blattextrakt: Extr. Bell. fol.
DAB 6
- b) handelsüblicher Wurzelextrakt: Extr. Bell. rad.
- c) Nativ-Frischblattextrakt eigener Herstellung *
- d) Handelsüblicher Wurzelextrakt, dreimal mit
Hauptpulver von Gerbstoffen befreit, im folgenden Extr. Bell. rad. "gerbstofffrei".

Extr. Bell. rad. "gerbstofffrei" verliert während der Hauptpulverbehandlung etwa 10% seines ursprünglichen Gewichtes. Alkaloide werden bei dieser Manipulation nicht in meßbarer Menge an das chromierte Hauptpulver gebunden, wodurch sich der Gehalt um etwa 10% erhöht.

* s.S.26

In Tabelle 1 sind die nach dem Monographie-Vorschlag für ein DAB 7-BRD erhaltenen Werte in % aufgeführt:

Extract. Bell.fol. DAB 6 (a)	Extract. Bell.rad. (b)	Nativ-Frisch- blatt-Extrakt (c)	Extr.Bell.rad. "gerbstofffrei" (d)
1,29	1,30	1,29	1,46
1,31	1,26	1,30	1,43
1,28	1,27	1,33	1,47
1,27	1,31	1,26	1,45
1,30	1,28	1,29	1,43
1,30	1,28	1,27	1,45
1,27	1,30	1,30	1,48
1,28	1,27	1,27	1,44
1,26		1,28	1,43
1,25		1,29	1,46
1,28	1,28	1,29	1,45

Tabelle 1: Von den Extrakten a-c entsprechen 77,5 mg = 1 mg Alkaloid, von Extrakt d entspricht 68,5 mg = 1 mg Alkaloid.

Die Pupillenerweiterung bei den Kaninchen gegenüber dem Ausgangsdurchmesser war ein Maß für die verabreichte Alkaloidmenge bzw. für den zu einer bestimmten Zeit vorhandenen Blutspiegel des l-Hyoscyamins.

Die Pupille wurde mit einer apparativen Anordnung kontrolliert, die WERNER (29) ähnlich beschrieben hat. Das Strahlenbündel einer 15 Watt-Mikroskopierlampe wurde im Abstand von 30 cm auf das Kaninchenauge gerichtet. Das Tier saß, ohne eingezwängt zu sein, in einem Haltekäfig. Der horizontale Pupillendurchmesser wurde mit einem einfachen Mikroskop mit Okularmikrometer bei schwacher Vergrößerung beobachtet. Um störende Lichteinfälle zu vermeiden, wurden die Versuche im Dunkellabor durchgeführt.

Vor Applikation von l-Hyoscyamin wurde der Pupillen-

durchmesser dreimal im Abstand von 10 Min. gemessen und so der Leerwert* ermittelt.

Nach oraler Applikation des l-Hyoscyamins (5 mg Base/kg, als Hydrochlorid in 5 ml Wasser gelöst) wurden anfangs häufig rasch wechselnde Weiten der Pupillen beobachtet, verursacht durch die Erregung des Tieres beim Einführen der Schlundsonde. An diese Behandlung gewöhnen sich die Tiere jedoch ziemlich rasch.

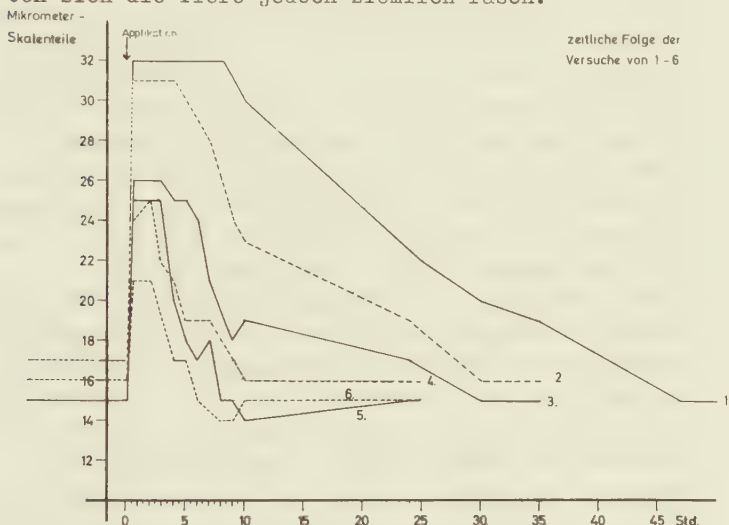


Abb. 2: Resorptionskurven für l-Hyoscyamin nach oraler Gabe beim selben Kaninchen im jeweiligen Abstand von 8 Tagen.

Nach einer Woche wurde jedes Tier unter denselben Bedingungen erneut in den Versuch genommen.

* Leerwert: horizontaler Durchmesser der Pupille nach 30 Sek. Belichtung.

WERNER ermittelte bei ferment-aktiven Tieren nach okularer und subkutaner Applikation eine Restitutionszeit* von 7-8 Stunden.

Wegen der sehr langdauernden Elimination des l-Hyoscyamins bei allen ferment-inaktiven Lebewesen (s.S.14) wurden l-hyoscyamin-acyl-hydrolase-aktive Tiere für die Versuche ausgewählt.

Bei peroraler Gabe von 5 mg l-Hyoscyamin/kg erreichten die Tiere den Leerwert erst nach 30-50 Std., eine andere Gruppe nach 20-40 Std. Der Versuch wurde nach jeweils einer Woche wiederholt. Dabei wurde festgestellt, dass die Restitutionszeiten von Woche zu Woche kürzer wurden, ohne dass einer der folgenden Versuche den Scheitelwert**, der mit der ersten Gabe erzielt wurde, erreichte (s.Abb.2). Erst nach der fünften Woche wurden Werte gemessen, die den von WERNER zitierten vergleichbar waren.

Schon ROTHLIN (25) berichtete, dass sich Kaninchen zu Injektionsversuchen gut eignen, da "deren Zerstörungsvermögen von Belladonna-Alkaloiden während 1-4 Stunden sozusagen unverändert ist". Der Autor stellte eine Adaptationszeit der Tiere an das Alkaloid fest.

Wörtlich: "Eine Einschränkung glaube ich machen zu müssen, indem sich zu Beginn der Versuche meistens keine gut vergleichbaren Resultate für gleiche Atropindosen ergaben. Es hat den Anschein, als ob das Tier an seine Aufgaben zu gewöhnen ist".

Die lange Einstellzeit der Kaninchen und die aufgetretenen Unsicherheitsfaktoren machten auch das Kaninchenauge zu einem ungeeigneten Testobjekt.

* Restitutionszeit: Zeitspanne zwischen Applikation und Erreichen des Leerwertes.

** Scheitelwert: Stärkste Erweiterung der Pupillen nach 30 Sek. Belichtung.

Durch den Spontanod zweier Tiere während der Hyoscyamin-Testreihe wurde evident, dass man bei langdauernden Versuchsreihen die Ergebnisse von der zufälligen Konstitution des Einzeltieres unabhängig machen musste.

2.2. Kontinuierliche, photometrische Messung der l-Hyoscyaminresorption

Bei der im Kaninchenversuch getroffenen Kontrollanordnung war zu bedenken, dass der Weg des Pharmakons von der Applikation bis zum Erfolgsorgan unkontrollierbar war. Es konnten Veränderungen am Wirkstoff eintreten, so dass dieser infolge einer partiellen oder totalen physiologisch-chemischen Umwandlung in abgeschwächter oder pharmakologisch unübersichtlichen Weise am Rezeptor angriff. Schon aus diesem Grunde war es opportun, die Messung an den Resorptionsort zu verlegen.

Aus den Arbeiten der BRODIE-Gruppe läßt sich ableiten, dass l-Hyoscyamin als Base im Dünndarm sehr gut resorbiert und über die Blutbahn abtransportiert wird.

Deshalb wurde einer durch Nackenschlag getöteten, etwa 300 g schweren, weißen, weiblichen Wistar-Ratte, Stamm FW 49 Biberach, die Leibeshöhle durch Mittelschnitt eröffnet und ein Teil des Dünndarmes (Ileum und z.T. Jejunum), vom Mesenterium befreit, herauspräpariert. Der Darm wurde in 37°C warme Tyrode-Lösung eingelegt und mit dieser gespült. Die Darmen wurden abgeklemmt, in das Lumen 1 mg l-Hyoscyamin, gelöst in 4 ml 37°C warmer, isotonomischer Tyrode-Lösung vom pH 7,3, infundiert und anschliessend sofort in ein auf 37°C thermostatisiertes Inkubationsgefäß in Tyrode-Lösung eingehängt.

Zur kontinuierlichen Messung war folgende apparative Anordnung vorgesehen: Die sauerstoffdurchperlte Bad-Tyrodelösung des Inkubationsgefässes wurde mittels einer Schlauchpumpe durch eine 2-cm-Durchflussküvette in einem Zeiss-Spektralphotometer geschickt, das bei 258 nm, dem Extinktionsmaximum des l-Hyoscyamins, die Extinktion der Bad-Tyrode registrierte.

Bei konstantem Bad-Volumen war mit wachsender l-Hyoscyamin-Permeation eine stetig ansteigende Extinktion der Lösung zu erwarten.(s.Abb.3)

Ein isolierter Rattendünndarm wurde mit Bad-Tyrode-Lösung, - ohne l-Hyoscyamin - in das vorbereitete Inkubationsgefäss gebracht. Auf die Dauer von zwei Stunden wurde in diesem Versuch, der einigemal wiederholt wurde, eine sich gegen Versuchsende stark erhöhende Extinktion registriert.

Nach Überprüfung ergab sich, dass das isolierte Organ bei der langen Überlebensdauer grössere Mengen an Proteinen und Nukleotiden verliert, deren Absorptionsmaxima im Bereich von 260 nm liegen und deshalb die Permeationswerte des l-Hyoscyamins überlagerten. Während der Dauer des Permeationsversuches von 60 Min. einschliesslich 20 Min. vorausgehender Präparationszeit blieb der Darm voll intakt. Die peristaltischen Bewegungen dauerten bis Versuchsende unvermindert an. Histologische Schnitte durch Mucosa, Serosa und die gesamte Darmwand wiesen nach 80 Min. keinerlei Wanddefekte auf.

Die kontinuierliche Extinktionsmessung war wegen der genannten Störungen unbrauchbar. Doch könnte die Versuchsanordnung für weitere Untersuchungen dann beibehalten werden, wenn die Bad-Tyrode in Abständen von 10 Min. abgelassen, durch frische Tyrode-Lösung ersetzt und auf den Gehalt an l-Hyoscyamin geprüft wurde.

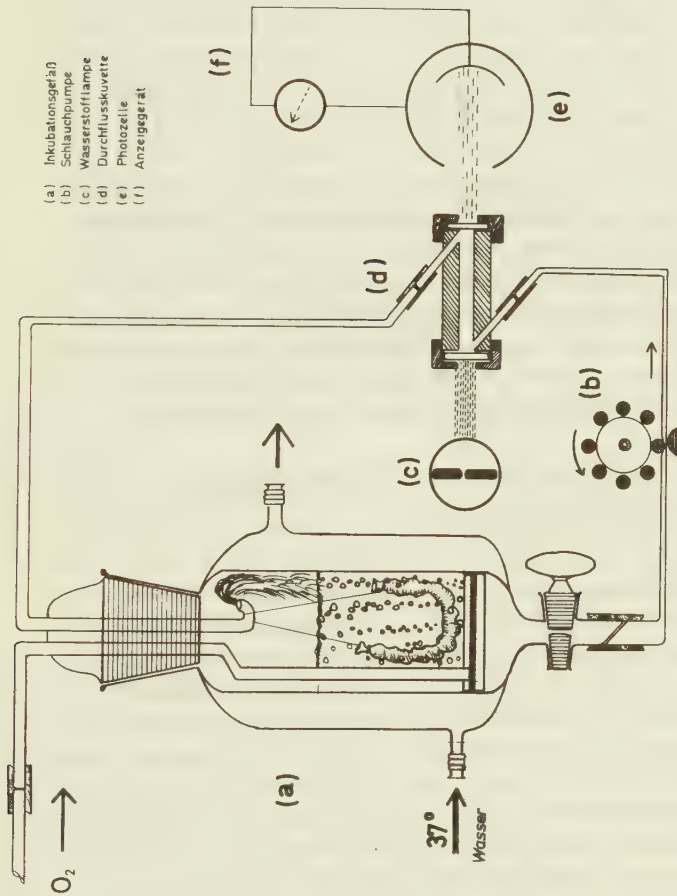


Abb. 3: Versuchsanordnung bei kontinuierlicher, photometrischer Messung.

In vorausgegangenen Versuchen wurden stark schwankende Resorptionsraten erhalten. Erst die Beachtung folgender drei Kautelen lieferten sowohl bei Reinalkaloiden als auch bei Extraktinfusionen gute, reproduzierbare Werte:

1. Isohydrie (von Bad- und Infusionstyrode-Lösung, pH 7,3)
2. Isotonie (von Bad- und Infusionstyrode-Lösung, $\Delta t = 0,56^{\circ}\text{C}$)
3. Phosphat-Isoionie (von Bad- und Infusionstyrode).

Um diese Anforderungen an die Lösungen zu erfüllen, mussten die Extraktlösungen mit einem Eigen-pH-Wert von 4,9 mit tertiärem Phosphat auf pH 7,3 gepuffert werden (Isohydrie). Das primäre Phosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und das sekundäre Phosphat KH_2PO_4 in der Tyrodevorschrift wurden zugunsten des Gesamt-Phosphations umgerechnet (Phosphat-Isoionie) und mit Kochsalz zur Isotonie der gesamten Lösungstyrode kompensiert.

2.3. Kolorimetrische Bestimmung kleiner l-Hyoscyaminmengen mit Indikatorfarbstoffen

2.3.1.

In der angewandten Versuchsanordnung mussten nach Permeation durch die Darmwand in der Bad-Tyrode Mikrogrammengen an l-Hyoscyamin erwartet werden, deren analytische Erfassung acidimetrisch nicht möglich war. CRONHEIM und WARE (30) beschrieben ein Verfahren zur Bestimmung kleiner Alkaloidmengen durch deren Bindung an saure Indikatorfarbstoffe (Additionsverbindungen) zu gefärbten, in organischen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln löslichen Komplexen. Sie sind besonders für die Toxikologie und Forensik geeignet, wo Alkaloide aus biologischem Material isoliert werden müssen (Harn, Faeces, Blut), Nach Ansicht der Verfasser können alle therapeutisch eingesetzten Alkaloide mit Ausnahme von Morphin nach der angeführten Technik bestimmt werden.

2.3.2.

EL DARAWAY et al. (31) fanden für die forensische Analyse eine Methode zur Bestimmung kleinster Mengen Strychnin im Harn, das gleichfalls auf der Bildung von Additionsverbindungen der Indikatorfarbstoffe aufgebaut ist. Das strychninhaltige Material wird auf einen pH-Wert von 8,5 gebracht und mit Benzol ausgeschüttelt. Da die Komplexstabilität stark pH-abhängig ist, wird das abgetrennte Benzol mit einer auf pH 7,4 gepufferten, wässrigen Bromthymolblau-Lösung geschüttelt, wobei die dem Strychnin äquimolare Indikatormenge komplex gebunden aufgenommen wird. Beim erneuten Alkalisieren der organischen Phase wird der Komplex gespalten und der Indikator gelangt in die wässrige Phase. Durch spektrophometrischen Vergleich im Absorptionsmaximum des Farbstoffes gegen bekannte Konzentrationen wird die Indikatormenge und somit indirekt die Alkaloidkonzentration ermittelt.

2.3.3.

HÄUSSLER (32) arbeitete unter Abwandlung der Vorschrift mit Tropäolin-OO (p-Anilino-azobenzol-sulfonsaures Natrium) als Indikatorfarbstoff und Chloroform als Komplexlösungsmittel. Im vorliegenden Fall war es erforderlich, exakt bei pH 4,6 zu arbeiten.

2.3.3.1.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden bekannte Alkaloidkonzentrationen in wässriger Lösung vorgelegt, bei pH 4,6 mit einer kalt gesättigten Tropäolin-OO-Lösung und Chloroform geschüttelt, abgetrennt und nach Ansäuern die Amethystfärbung der Chloroformlösung bei 545 nm im Photometer gemessen. Die vorgelegten Mikrogramm-Mengen 1-Hyoscyamin und die gemessenen Extinktionen sind in Tabelle 2 zusammen-

mengestellt.

Die Extinktionen der Eichkurve wurden gegen reines Chloroform gemessen. Die Nullabweichung erklärt sich aus einem geringen, mit Chloroform mischbaren Anteil wässriger Lösung, in der Spuren von Tropäolin-00 gelöst bleiben.

25	50	75	100 μ F
0,120	0,170	0,208	0,265
0,120	0,173	0,218	0,266
0,120	0,175	0,224	0,290
0,122	0,175	0,225	0,293
0,123	0,177	0,232	0,294
0,128	0,189	0,232	0,295
0,123	0,190	0,239	0,295
0,138	0,190	0,240	0,295
0,140	0,190	0,250	0,295
0,140	0,195	0,254	0,302
0,140	0,196	0,256	0,303
0,141	0,200	0,270	0,324
0,130	0,185	0,237	0,293

Tabelle 2: Extinktionen der Eichkurve steigend geordnet

HÄUSSLER lässt die Chloroform-Komplexlösung herstellen "unter Vermeidung jeglicher Spuren von Wasser". In praxi liess sich die Lösung nur schwer absolut wasserfrei erhalten, da jedes eingesetzte Trockenmittel einen Teil des Farbstoffkomplexes adsorbierte.

2.4. Resorptionsversuche am überlebenden Rattendünndarm

Mit der vorausgehend beschriebenen apparativen Anordnung, sollte die Permeation von Tropa-Alkaloiden, vornehmlich 1-Hyoscyamin, durch den isolierten, überlebenden Rattendünndarm geprüft werden. Nach Infusion des Pharmakons in das Darmlumen und Einhängen des Darmes in das Inkubationsgefäss, wurde im Abstand von genau 10 Min. sechsmal die Bad-Tyrode gewechselt und jeweils der Alkaloidgehalt nach HÄUSSLER bestimmt.

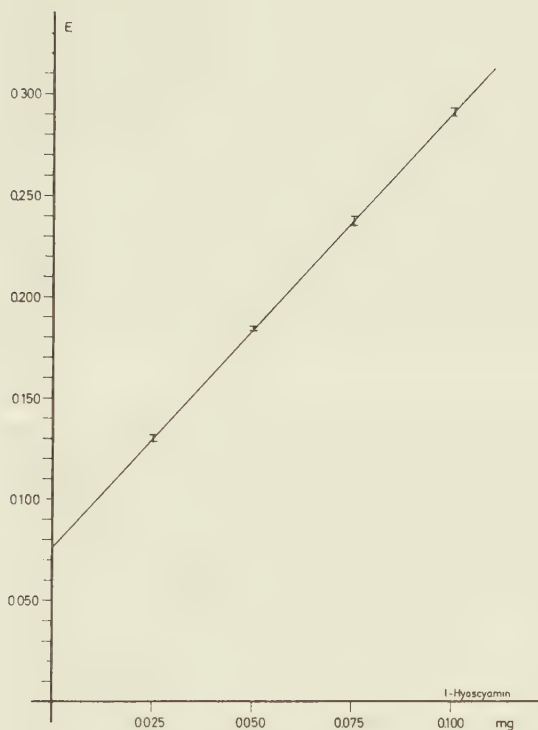


Abb. 4: Eichkurve des Tropäolin-OO-l-Hyoscyamin-Komplexes.

Zunächst interessierte die Permeationsrate von l-Hyoscyamin. Eine 0,025%ige l-Hyoscyamin-Tyrodelösung wurde kryoskopisch auf Blut-Isotonie geprüft. Gegenüber destilliertem Wasser wurde eine Depression von $\Delta t = 0,58^{\circ}\text{C}$ gemessen. Durch Zufügen der geringen Menge l-Hyoscyamin änderte sich die Depression praktisch nicht.

2.4.1.

In dem vorbereiteten, etwa 30 cm langen Rattendünndarm von 3,0-3,5 g wurden 4 ml 1-Hyoscyamin-Tyrolösung, entsprechend 1 mg Alkaloid, unter Konstanthaltung der Spültemperatur und Einhalten einer einheitlichen Präparationszeit, mittels einer Injektionsspritze infundiert und wie vorstehend verfahren.

Durch Addition der Extinktionen der einzelnen Meßproben in der Reihenfolge des Versuchs erhält man das Resorptionsprofil von 1-Hyoscyamin unter den gegebenen Bedingungen, das in Abb. 5 aufgetragen ist. Die Kurve stellt einen Mittelwert aus sieben Einzelversuchen dar.

2.4.2.

Würden die Begleitstoffe der galenischen Zubereitung die Resorptionsgeschwindigkeit des 1-Hyoscyamins im Sinne einer Hemmung oder Beschleunigung beeinflussen, wäre zu erwarten gewesen, dass bei dem unter den gleichen Bedingungen wie bei 1-Hyoscyamin applizierten Nativ-Frischblatt-Extrakt der Anstiegswinkel der Blatt-Extrakt-Resorptionskurve sich von ersterer unterscheidet.

Unter Nativ-Frischblatt-Extrakt sei hier ein Extrakt verstanden, der abweichend von der DAB-Methode wie folgt hergestellt wurde.

Damit zwischen Ernte und Verarbeitung keine unkontrollierten enzymatischen Veränderungen im Blatt eintreten konnten, wurden die Belladonna-Blätter beim Sammeln von der Staude herunter sofort in Trockeneis eingefroren, und, ohne aufzutauen, mit verdünntem Methanol übergossen und dann extrahiert. Der soerhaltene Extrakt wurde mit Dextrin auf 1,29% Gesamtalkaloid nach dem Monographie-Entwurf für das DAB 7-BRD eingestellt und als Nativ-Frischblatt-Extrakt bezeichnet.

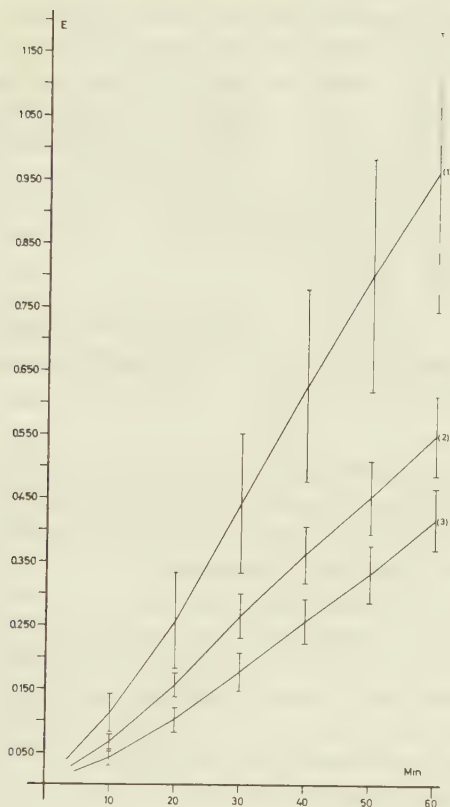


Abb. 5: Resorptionsprofil von Nativ-Frischblatt-Extrakt (1)
l-Hyoscyamin (2)
DAB 6-Wurzelextrakt (3)

4 ml einer solchen Extrakt-Tyrodellösung, entsprechend 77,5 mg Extrakt = 1 mg Alkaloid, die den gestellten drei Forderungen genügten, wurde in den vorbereiteten Rattendünndarm infundiert und nach jeweils 10 Min. eine Analysenprobe entnommen.

Die in Abb. 5 dargestellten Extinktionen sind Mittelwerte aus 11 Infusionsversuchen.

10	20	30	40	50	60 Min.
0,112	0,258	0,442	0,627	0,803	0,964
0,067	0,158	0,266	0,362	0,452	0,551
0,043	0,103	0,178	0,258	0,333	0,419

Tabelle 3: Extinktionen nach 10-60 Min. von
Nativ-Frischblatt-Extrakt
l-Hyoscyamin
Wurzel-Extrakt

Es wurde eine zwischen 50 und 70% liegende Abweichung von jedem Meß-Wert des l-Hyoscyamins erreicht, die statistisch signifikant ist.

2.4.3.

Nach den eklatanten Unterschieden in der Resorption zwischen l-Hyoscyamin und Nativ-Frischblatt-Extrakt, prüften wir als extremen Gegensatz des Verhalten eines handelsüblichen Wurzelextraktes.

In der üblichen Versuchsanordnung wurden 4 ml (entsprechend 77,5 mg Extrakt = 1 mg Alkaloid) im Vergleich zur Bad-Tyrode isotonische, isohydrische, phosphat-isoionische Extraktlösung in den vorbereiteten Rattendarm infundiert und in einer Stunde 6 Analysenproben erhalten.

Die in Abb. 5 eingezeichneten Extinktionen stellen Mittelwerte aus 6 Einzelversuchen dar.

Die Abweichungen zwischen 35-25% von den Resorptionswerten des l-Hyoscyamins sind signifikant.

Aus diesem Ergebnis wäre zu folgern, dass die Wurzel-droge Begleitstoffe enthalten muss, die eine Alkaloid-Resorption stark verzögern.

2.4.3.1.

Eine der augenfälligsten Begleitstoff-Gruppen des Wurzelextraktes sind die Gerbstoffe. Aus diesem heterogenen Substanzgemisch sind nur wenige in ihrer

Struktur aufgeklärt. Die uns bekannten Stoffe sind meist Abbauprodukte oder Einzelbausteine eines Gerbstoff-Makromoleküls, die als Hydrolyseprodukte anfallen. In der Literatur wird oft die Vermutung ausgesprochen, dass die Gerbstoffe in hochglykosidierter Form vorliegen. FIEDLER und HILDEBRAND (33) konnten aus gerbstoffhaltigen Pflanzenauszügen Gallussäure- und Phenylpropankörperderivate darstellen wie Gallussäure, m-Digallussäure, Elagsäure, Polydigalloylglucose, Chinasäure, Kaffeesäure, Chlorogensäure und Catechin.

Physiologisch beschränkt sich die Wirksamkeit der Gerbstoffe auf die Zelloberfläche. Eine Veränderung der Gefäßwandmakrostruktur und der Zellpermeabilität werden diskutiert. Therapeutisch werden Gerbstoffe als Haemostyptica bei lokalen Blutungen eingesetzt. Sie bilden schwerlösliche Verbindungen mit Proteinen und Alkaloiden. Erythrozyten werden von Gerbsäuren agglutiniert, die Hämolyse wird gehemmt.

Im Darmkanal werden die phenolischen Glykoside rasch gespalten, sodass sie im unteren Dünndarm kaum noch adstringierend wirken können. Das Deutsche Arzneibuch führt eine Eiweiß-Gerbsäure-Verbindung, das Tannalbin. Da Eiweiß-Gerbsäure-Koagulate sehr schwer löslich sind, nimmt man an, dass diese als nichtresorbierbare Stoffe den Magen-Darm-Trakt unverändert passieren oder langsam abgebaut werden und so auf der gesamten Länge des Darmkanals bis in die hinteren Abschnitte des Dickdarms eine adstringierende Wirkung ausüben.

Bei Alkaloidvergiftungen können Gerbstoffe als vorläufiges Hilfsmittel gegeben werden. Als Alkaloidfällungsmittel bilden sie schwerlösliche Salze, aus denen die Alkaloide auch wieder freigesetzt werden können, weshalb der Magen bald entleert werden muss. Die experimentellen Befunde HENSCHLERS und KREUTZERS

(34), in denen der Wirkungsverlust von Tierkohle durch Gerbstoffe im Universalantidot festgestellt wurde, stehen hierzu nicht im Widerspruch. Geringe Gerbstoffkonzentrationen wirken schon exsudierend, weshalb ein antiphlogistischer Effekt nach SCHMID (35) nicht nachgewiesen werden konnte.

2.4.3.2

Zur Prüfung der Frage, ob die Gerbstoffe der Belladonna-Extrakte die Resorptionsverzögerung bewirken, musste deren mengenmässiger Anteil in den Extrakten ermittelt werden.

KRIEGER (36) stellte in vergleichenden Untersuchungen des Gerbstoffgehaltes verschiedener Drogen in einer Übersicht die in der Literatur bekanntgewordenen Gerbstoff-Fällungsreagentien zusammen und kommentierte häufig angewandte Bestimmungsmethoden.

Oft zitiert werden:

Hautpulvermethode nach SCHRÖDER (37)

Kupferacetatmethode nach LINDE und TEUFER (37)

Methode nach LÖWENTHAL/NEUBAUER (38).

In Ermangelung besserer Vorschriften wird die Hautpulvermethode viel gebraucht, liefert jedoch bei grossem Arbeitsaufwand, wie alle Autoren konzedieren, zu hohe Werte und breite Streuungen in den Versuchsserien.

Vergleichbare Werte konnten mit der Kupferacetat-Methode nach LINDE und TEUFER nicht erzielt werden.

Die Oxidationsmethode mit Permanganat ist in der Nahrungsmittelchemie und bei Gerbstoff-Bestimmungen von Weinen üblich, wurde aber hier nicht eingesetzt. Um die teilweise sehr langwierigen und aufwendigen Verfahren zu umgehen, wurde für die Übersichtsbestimmung in den vorgenannten Extrakten einer Bleichlorid-Fällung mit photometrischer Auswertung der Vorzug gegeben.

Hautpulver-M.	19%	13%	15%	-
Cu-Acetat-M.	9,9%	7,2%	8,4%	-
PbCl ₂ -M.	12%	7,0%	3,5%	1,7%
	(a)	(b)	(c)	(d)

Tabelle 4: Gerbstoffgehalt nach den verschiedenen Vorschriften. Nativ-Frischblatt-Extr.(a), DAB 6-Blatt-Extr.(b), Wurzel-Extr. (c), Wurzel-Extr. "gerbstofffrei" (d).

2.4.4.

Zur Prüfung einer resorptionsverzögernden Wirkung der Gerbstoffe wurde ein handelsüblicher Wurzel-extrakt mehrfach mit chromiertem Hautpulver "Merck" behandelt, um ihn von Gerbstoffen möglichst zu befreien. Nach Gefriertrocknung des Spissum-Extraktes wurde dieser "gerbstofffreie" Extrakt nach der Kupferacetat-Methode nach LINDE und TEUFER auf etwa vorhandenen Gerbstoff geprüft. Es wurden keine Cu-Tannat-Niederschläge erhalten.

4 ml, entsprechend 68,5 mg Wurzelextrakt "gerbstofffrei" = 1 mg Alkaloid, der gegen die Badtyrode isotonischen, isohydrischen und phosphat-isoionischen Extraktlösung wurden in den vorbereiteten Rattendünndarm infundiert und im genauen Abstand von 10 Min. die Analysenproben abgenommen. Die vorliegenden Ergebnisse sind Mittelwerte von 11 Permeationsversuchen. Die prozentualen Abweichungen von den Permeationswerten des 1-Hyoscyamins, die bei Versuchsbeginn 31%, nach 60 Min. 17% unter diesen lagen, sind signifikant.

Obgleich die Resorptionskurve des handelsüblichen Wurzelextraktes durchweg um etwa 10% tiefer liegt als die desselben, vom Gerbstoff befreiten Extraktes, lässt sich ein Unterschied statistisch nicht sichern. Die Unterschiede waren allenfalls graduell.

2.4.5.

Um die vermutete Gerbstoffwirkung der Belladonna-Extrakte experimentell zu stützen, wurde mit einem Kollektiv von 13 Rattendünndärmen und einer Lösung von l-Hyoscyamin und Tannin gearbeitet.

Je 2 ml (= 1 mg l-Hyoscyamin und 10 mg Tannin) einer 0,05%igen l-Hyoscyamin-Tyrodelösung und einer 0,5%igen Tannin "Merck"-Tyrodelösung wurden unmittelbar vor der Infusion in den Darm in einer Injektionsspritze aufgezogen, gemischt, wobei eine Trübung festzustellen war, und sofort appliziert. Die Endkonzentration an Tannin betrug 0,25%.

Die Versuchsanordnung war wie üblich.

Durch Zugabe der geringen, undissoziierten Stoffmengen, die durch Ausflockung in der Lösung kryoskopisch nicht wirksam wurden, wurde die Isotonie der Lösungstyrode nicht verändert. Die Depression lag bei Δt 0,58°C. Die negative Abweichung von der l-Hyoscyamin-Resorptionskurve bewegt sich zwischen 17 und 27% und liegt an der Grenze der Signifikanz. Der Unterschied ist statistisch noch gesichert.

2.4.6.

In einer zweiten Tannin-Hyoscyamin-Reihe wurde die Tanninkonzentration verdoppelt.

Je 2 ml 0,05%ige l-Hyoscyamin-Tyrodelösung und Tannin-Tyrodelösung, entsprechend 1 mg l-Hyoscyamin und 20 mg Tannin, wurden unmittelbar vor der Infusion in den Rattendünndarm in einer Injektionsspritze aufgezogen, gemischt, wobei eine Trübung auftrat und sofort appliziert. Die Endkonzentration an Tannin betrug 0,5%.

Die in Abb. 6 aufgetragenen Werte sind aus 3 Versuchen gemittelt und bleiben anfangs 28%, bei Versuchsende 32,7% unter der l-Hyoscyamin-Resorptionsrate zurück. Der Unterschied zwischen beiden Serien ist signifikant.

Die Versuchsreihen mit 0,25 und 0,5%iger Tannin-Tyrodellösung bestätigten die Resorptionshemmung des l-Hyoscyamins durch Gerbstoffe. Die Vermutung, dass die Differenz von 10% zwischen beiden Tanninkurven konzentrationsbedingt war, liess sich statistisch nicht sichern. Mit den vorgelegten Tanninkonzentrationen konnte eine gleichstarke Hemmung erzielt werden, wie sie bei dem Wurzelextrakt, ja sogar beim "gerbstofffreien" Wurzelextrakt gemessen wurde.

Es wird für wahrscheinlich gehalten, dass die unterschiedlichen Fällungsreagentien nicht alle in einem Gemisch vorliegenden, von der Struktur her sehr verschiedenen Gerbstoffe quantitativ fällen. Damit liesse sich erklären, dass der mittels Hautpulver vom Gerbstoff befreite Wurzelextrakt, noch ausreichend Gerbstoffe enthielt, - mit Bleichlorid wurde eine Trübung verursacht, - um die vorliegenden Alkaloide zu fällen und eine signifikante Resorptionshemmung zu bewirken.

Aus den Gerbstoffgehaltsbestimmungen geht hervor, dass die Gehalte aller eingesetzten Blatt- und Wurzelextrakte in der gleichen Grössenordnung liegen.

2.4.7.

Von den vorgesehenen Extrakten war noch der offizielle Blattextrakt zu prüfen.

4 ml einer Extr. Bell. fol. DAB 6-Lösung, entsprechend 77,5 mg Extrakt oder 1 mg Alkaloid, die die gestellten Forderungen der Isotonie, Isohydrie und Phosphat-Isoionie zur Bad-Tyrode erfüllten, wurden in den vorbereiteten Rattendünndarm infundiert und in der beschriebenen Weise die sechs Analysenproben entnommen. Für diese Versuchsanordnung wurde ein Kollektiv von 12 Tieren eingesetzt.

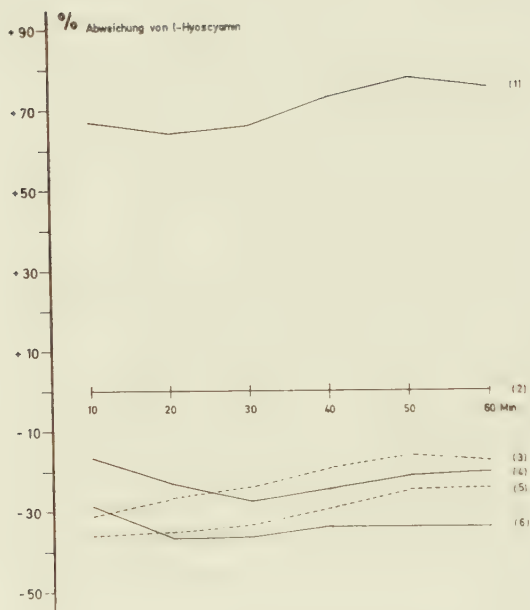


Abb. 6: Prozentuale Abweichung der Mittelwerte von denen des l-Hyoscyamins Nativ-Frischblatt-Extr. (1), l-Hyoscyamin (2), Wurzel-Extr. "gerbstofffrei" (3), 0,25% Tannin (4), handelsüblicher Wurzelextr. (5) und 0,5% Tannin (6).

Die Resorptionswerte lagen durchschnittlich 10% tiefer als die des l-Hyoscyamins und somit weit unter der statistisch gesicherten Wahrscheinlichkeit (s. Abb. 13, Nr. 4).

Zusammenfassend sei festgestellt: Verglichen mit den Resorptionswerten des l-Hyoscyamins weisen alle gerbstoffhaltigen Extrakte und Tannin-l-Hyoscyamin-Lösungen geringere Resorptionsraten auf. Während Wurzel-Extrakte und Tanninlösungen einen signifikanten Unterschied erzeugen, liegt der offizinelle Blattextrakt im Wahrscheinlichkeitsbereich des Reinalkaloids. Bei einem höheren Gerbstoffgehalt als dem der aufgeführten Zubereitungen wurden bei dem Nativ-Frischblatt-Extrakt höhere Resorptionsraten registriert. Bei den Wurzelextrakten kann der Begleiter Gerbstoff für die Hemmung verantwortlich gemacht werden, während bei dem Blattextrakt eigener Herstellung ein anderes Prinzip die Wirkung des Gerbstoffes überkompensieren muss.

Alle aufgeführten Resorptionsversuchsreihen wurden mit Ausnahme der β -Glucosidase-Versuche nach 12 Monaten reproduziert. (Siehe Zusammenstellung der Stoffwerte in Tabelle 5, S. 53)

2.4.7.1.

In der grossen Gruppe der Naturstoffe gewinnen die Flavone therapeutisch immer mehr an Bedeutung, wie man sich leicht in der Literatur der letzten Jahre überzeugen kann. Sie kommen ubiquitär in Blüten- und Laubblättern von Kräutern, Stauden und Sträuchern vor. Nach PETER, FISEL, WEISER (39) ist einem aus *Ginkgo biloba* Blättern isolierten Wirkstoffkomplex eine gefässerweiternde und spasmolytische Wirkung zuzuschreiben. VOGEL und STRÖCKER (40) konnten einen gefässdichtenden und lymphagogen Effekt nachweisen. Mit der Analytik der Flavonolglykoside beschäftigten sich CHRIST und MÜLLER (41), HUBACEC und TROJNA (42), LIST (43), STEINEGGER und SONANINI (44) und andere. Nach den genannten Autoren werden Flavone immer als Glykoside aufgefunden.

Belladonna-Blatt- und Wurzelextrakt lassen sich leicht durch das Fehlen von Flavonolglykosiden bei letzteren unterscheiden (s. Abb. 8).

Es lag nahe, die hohe Resorptionsrate des Nativ-Frischblatt-Extraktes einer physiologischen Wirkung der Flavonoltriglykoside zuzuschreiben.

Es war zu prüfen, wieweit die von LIST und HANAFI (43) und STEINEGGER und SONANINI (44) beschriebenen, genuinen Flavonoltriglykoside die Resorptionsgeschwindigkeit beeinflussten.

Die genuinen Flavonoltriglykoside A + B wurden aus einem DAB 6-Blattextrakt des Handels und einem Nativ-Frischblatt-Extrakt eigener Herstellung, in dem keine Abbaustufen wie Diglykoside und Monoglykoside gefunden werden konnten, isoliert.

Die Extrakte wurden in einem Ultra Turrax 3 Min. mit 90%igem Methanol extrahiert, und der verbleibende Rückstand noch einmal in gleicher Weise behandelt. Das Lösungsmittel wurde bei 40° am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Durch diese Manipulation erreicht man

eine bessere Löslichkeit des Methanolextraktes in dem Fliessmittel, in dem er gelöst auf eine vorbereitete Polyamidsäule aufgetragen und chromatographiert wurde (43). Die Flavonoltriglykoside wanderten kurz hinter der Fliessmittelfront und wurden so mit wenigen Begleitstoffen zusammen erhalten.

Zum Zwecke weiterer Reinigung der Triglykoside wurden Cellulose-Schicht-Platten hergestellt, das erhaltene Stoffgemisch mit einem eigens dafür entwickelten elektromechanischen Auftragegerät* strichförmig aufgesprüht und in dem Fliessmittel Aethylacetat, Ameisensäure, Wasser = 10:2:3 chromatographiert. Durch mehrfaches Aufsteigenlassen des Fliessmittels wurde eine gute Trennung der Flavonoltriglykoside in vier, bei 366 nm dunkel absorbierende Zonen erreicht. Eine fünfte fluoreszenzlöschende Zone, die vor den Triglykosiden der A-Reihe läuft, bildete mit $AlCl_3$ einen gelb fluoreszierenden Komplex und kann deshalb als Flavonol bezeichnet werden. Die isolierte Verbindung erwies sich als labil und ging nach wenigen Wochen Stehenlassen unter Lichtabschluss in das Triglykosid B über.

* Bei dem elektromechanischen Auftragegerät handelt es sich um folgende Konstruktion: Ein Schlitten, auf dem Trägerplatten leicht geneigt stehen oder ein Papierbogen eingespannt ist, bewegt sich im einstellbaren Abstand mit völlig gleichmässiger Geschwindigkeit vor einer oder mehreren Düsen hin und her. Das aufzutragende Stoffgemisch wird in einem beliebigen Lösungsmittel gelöst und mit regulierbarem Luftdruck (0,01 Atü oder höheren Drücken) auf das Adsorbens aufgesprüht. Das aufzutragende Volumen ist exakt dosierbar. Eine oder mehrere Injektionsspritzen liegen auf der Gabel einer Infusionsmaschine, die den Stempel der Injektionsspritzen nach innen bewegen. Durch die Wahl der Übersetzung im Stufengetriebe der Infusionsmaschine und der Grösse der Injektionsspritze ist jedes beliebige Volumen in gewünschten Zeitabschnitten aufzusprühen. Die minimale Leistung liegt bei etwa 0,2 ml/Std., bezogen auf eine 1-ml-Tuberkulinspritze im Vorschub. Die Konstruktion ermöglicht ein völlig gleichmässiges Auftragen von gelösten Stoffen, ohne daß es an den Wendepunkten des Schlittens zu überladenen und deshalb sich feucht ausbreitenden Stellen käme.

Auf Polyamid-Dünnschichtplatten mit dem Fließmittel Wasser, Aethanol, Methyläthylketon, Acetylaceton = 65:15:15:5 chromatographiert, zeigte sie denselben Rf-Wert wie die Flavonoltriglykoside, $R_f = 0,82$. Da es sich um ein im Fließmittel gebildetes Artefakt zu handeln scheint, wurde der Verbindung keine Bedeutung beigemessen.

Die aus der Cellulose mit Wasser herausgelösten Triglykoside wurden auf Cellulose-Schicht-Platten in dem Fließmittel n-Propanol, Äthylacetat, Wasser = 3:4:2 rechromatographiert und rein erhalten.

2.4.8.

In 4 ml 1-Hyoscyamin-Tyrode, entsprechend 1 mg Alkaloid, wurden 5, 6, 6 und 10 mg Flavonoltriglykosid B (Kämpferol-3-rhamnogalaktosido-7-glucosid) gelöst und sofort infundiert (0,125-0,25%ige Lösung). Die Infusionslösung blieb völlig klar. Bei einer parallel zur 1-Hyoscyamin-Kurve verlaufenden Abweichung von 15-13% Mehrresorption konnte dennoch keine Signifikanz errechnet werden. Die erhaltenen Werte liegen im Wahrscheinlichkeitsbereich der 1-Hyoscyamin-Kurve.

2.4.9.

Um eine evtl. Dosis-Wirkungsbeziehung festzustellen, wurde in der nachfolgenden Serie mit geringerer Triglykosid-Konzentration gearbeitet. In 4 ml 1-Hyoscyamin-Tyrode, entsprechend 1 mg Alkaloid, wurde 1 mg Flavonoltriglykosid B gelöst und infundiert (0,025%ige Lösung). Das Kollektiv bestand aus 10 Tieren. Mit 51-45% negativer Abweichung von den 1-Hyoscyamin-Werten ist diese signifikant.

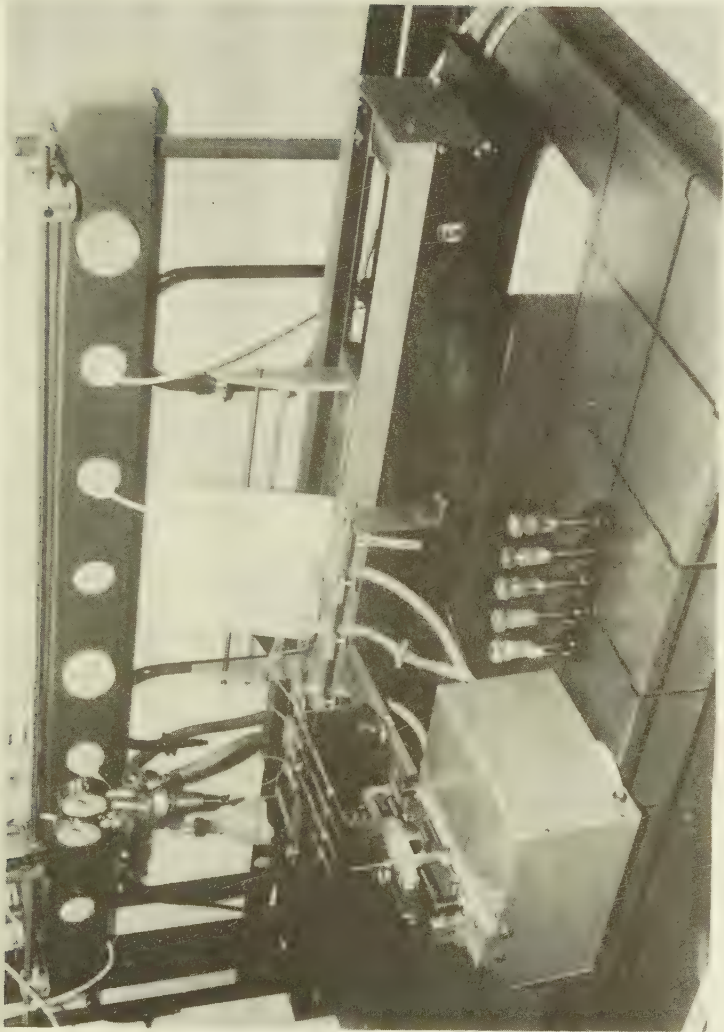


Abb. 6a: Elektromechanisches Auftragegerät.

Elektromechanisches Auftragegerät

für Dunnschicht- und präparative Schichtchromatographie

Seitenansicht

Schnitt schematisch

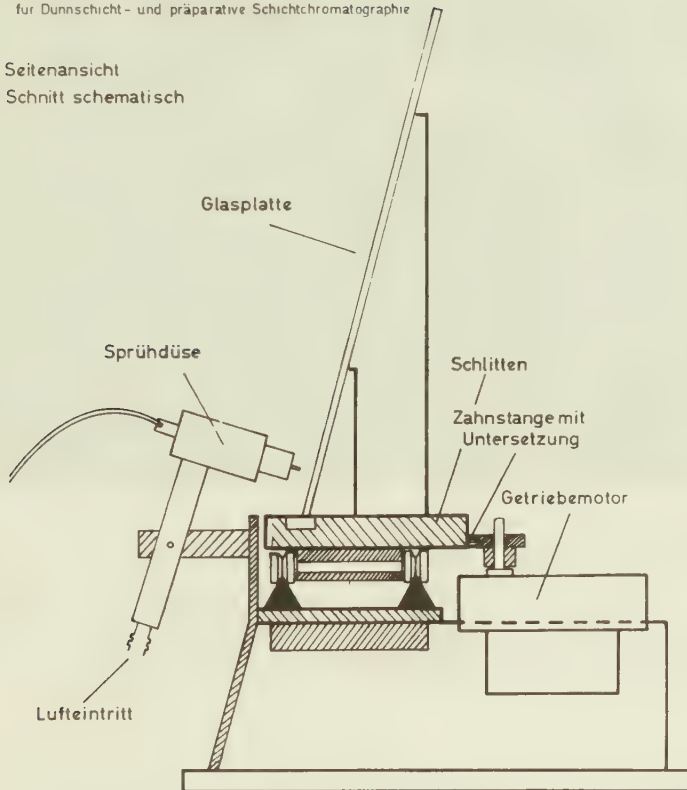


Abb. 7: Elektromechanisches Auftragegerät



Abb. 8: v.l.n.r. Nativ-Frischblatt-Extrakt I
DAB 6-Blattextrakt
Nativ-Trockenblattextrakt *
Nativ-Frischblatt-Extrakt II
handelsüblicher Wurzelextrakt
Wurzelextrakt "gerbstofffrei"

* Unter Nativ-Trockenblatt-Extrakt wird ein Tollkirschenextrakt verstanden, der aus eingefrorenen, dann sofort im Kaltluftstrom getrockneten Blättern hergestellt wurde.

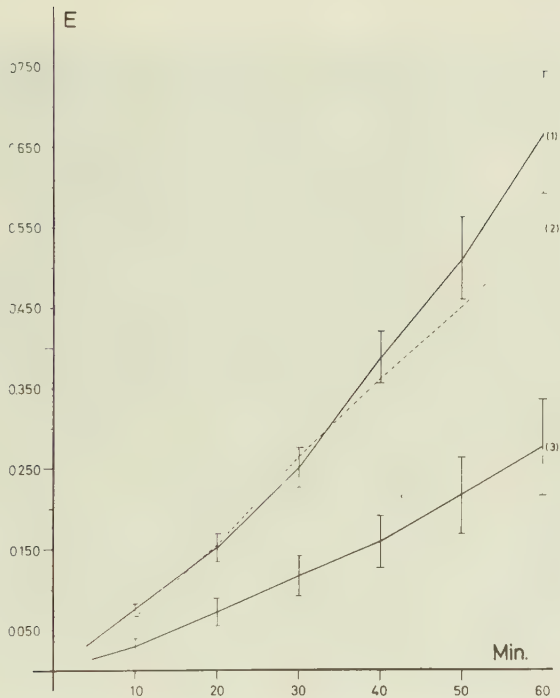


Abb. 9: Dosis-Wirkungsbeziehung von
Flavonoltriglykosiden

- 1 mg l-Hyoscyamin + 5 mg Flavonoltriglykosid B (1)
1 mg l-Hyoscyamin (2)
1 mg l-Hyoscyamin + 1 mg Flavonoltriglykosid B (3)

Bei der 5 mg-Triglykosid-Serie war trotz 15-13% Mehrresorption kein Unterschied von den l-Hyoscyamin-Werten zu sichern, was einem indifferenten Verhalten gegenüber l-Hyoscyamin gleichkäme. Die Hemmung von 51-45% fand dagegen keine Erklärung.

Beim Aufarbeiten des nach 60 Min. anfallenden Darminhaltes, sei es von infundiertem Blattextrakt oder reinen Flavonoltriglykosiden, wurden hauptsächlich 3,3-Diglykoside, in geringen Mengen 3,7-Diglykoside und Aglykone gefunden.



Abb. 10: v.l.n.r.

1. Nativ-Frischblatt-Extr.
2. Triglykosid B-Reinsubstanz
3. Nativ-Frischblatt-Extr. nach 60 Min. Verweilzeit im Rattendünndarm
4. Nativ-Frischblatt-Extr.-Tyrode, 18 Std. bei 37°C im Brutschrank
5. Flavonoltriglykoside A u. B im Glykosidase-Versuch
6. Flavonoltriglykoside A u. B im Normalversuch
7. Rutin, Quercetin
8. Wie 3
9. DAB 6-Blattextrakt nach 60 Min. Verweilzeit im Rattendünndarm.

2.4.10.

Nach Kenntnis der Abbaustufen war zu folgern, dass die sehr gut wasserlöslichen Flavonoltriglykoside aufgrund ihrer Hydrophilie vermutlich nicht in die lipide Membran eindringen können (s.S.9), um pharmakologisch wirksam zu werden. Ein physiologischer Effekt war bestenfalls von lipophileren Substanzen zu erwarten. Versuche mit den geforderten Eigenschaften waren zunächst nicht zu verwirklichen, da die Diglykoside schlecht, Monoglykoside und Aglykone kaum in Wasser löslich sind.

Durch Abspaltung eines Moleküls Glucose in 7-Stellung des Flavonoltriglykosides A erhält man Rutin, ein Quercetindiglykosid, das auch bevorzugt während des Permeationsversuches im Rattendünndarm entstand. Davon wurde eine kalt gesättigte Lösung mit Tyrode hergestellt. Im Gegensatz zu den Triglykosiden weist diese Substanz mehr lipophile Eigenschaften auf. Man konnte erwarten, dass Rutin gelöst an die Membran gebracht wird und schneller in diese eintreten kann, um so nach kurzer Zeit die l-Hyoscyamin-Permeation zu beschleunigen.

4 ml kalt gesättigte l-Hyoscyamin-Rutin-Tyrode-Lösung, entsprechend 1 mg Alkaloid, wurden in den Rattendünndarm infundiert und die Permeationsrate des l-Hyoscyamins bestimmt. Es wurden 11 Einzelversuche durchgeführt.

Nachdem die Rutinkurve vom Ausgangswert des l-Hyoscyamins ansteigt, erreicht sie nach 30 Min. ein Maximum und behält dieses mit 11,8-11,5% positiver Abweichung in parallelem Verlauf bei. Selbst wenn die Werte die gesetzte Hypothese erfüllen, können sie zur Klärung der anstehenden Fragen nicht herangezogen werden, weil sie von der l-Hyoscyamin-Kontrolle statistisch nicht signifikant abweichen (s.Abb.11).

2.4.11.

Von dem sehr lipophilen Aglykon Quercetin war zu erwarten, dass dieses eine höhere Resorptionsrate des l-Hyoscyamins bewirken könne, sofern es der Mucosazelle gelöst zugänglich gemacht werden konnte. Durch leichtes Erwärmen auf 40°C wurde eine 0,025%ige Quercetin-l-Hyoscyamin-Tyrodellösung hergestellt. 4 ml dieser Lösung, entsprechend 1 mg Alkaloid und 1 mg Quercetin, wurden in den vorbereiteten Rattendünndarm infundiert. In der Reihe wurden 12 Einzelversuche durchgeführt.

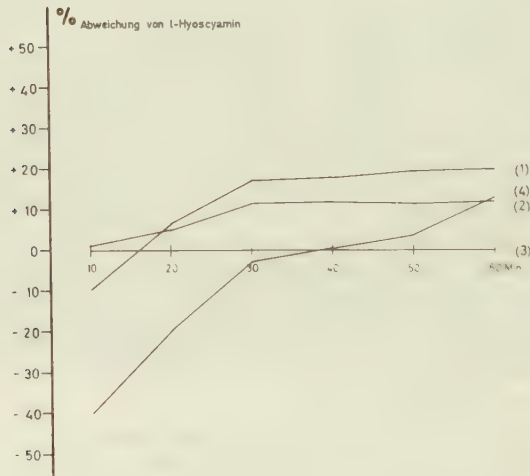


Abb. 11: Resorptionskurve von: 1 mg Quercetin (1)
gesättigte Rutin-Lösung (2)
l-Hyoscyamin (3)
5 mg Quercetin-Ammoniumsalt (4)

Die Kurve erreichte vom Ausgangswert des l-Hyoscyamins aufsteigend nach 30 Min. ein Maximum, das sie in parallelem Verlauf zur l-Hyoscyaminkontrolle einhält.

Auch diese Werte erfüllten die gestellte Hypothese, besitzen aber keine Aussagekraft, da sich der Unterschied mit 17-19% Abweichung von der Kontrolle statistisch nicht sichern lässt.

2.4.12.

Eine Resorptionssteigerung war in beiden Systemen nicht zu erreichen, da der Effekt vermutlich durch eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit bedingt ist, Konzentrationserhöhungen der Flavonolglykoside und des Aglykons aber wegen der schlechten Wasserlöslichkeit der Substanzen nicht möglich waren.

Wasserunlösliche Flavonolglykoside mit freien, phenolischen Hydroxylgruppen und Aglykone bilden gut wasserlösliche Alkali -und Ammoniumsalze.

Es wurde das Ammoniumsalz des Quercetins hergestellt und im Resorptionsversuch geprüft. ●

4 ml Quercetin-l-Hyoscyamin-Tyrodellösung, entsprechend 5 mg Quercetinammoniumsalz (= 0,125%) und 1 mg l-Hyoscyamin, wurden in den Rattendünndarm infundiert.

Das Kollektiv umfasste 5 Tiere. Die Resorptionskurve zeigt einen ansteigenden Verlauf. Ähnlich wie bei den wasserlöslichen Triglykosiden liegen die Anfangswerte signifikant 40% unterhalb denen des l-Hyoscyamins, erreichen diese nach 30 Min., ohne sich nach 60 Min. davon signifikant zu unterscheiden (s.Abo.11). Aus der ansteigenden Kurve konnte man folgern, dass das Quercetinammoniumsalz erst nach etwa 30 Min. in die wirksame Form übergeführt wurde und nun resorptionsfördernd in den Permeationsprozess eingriff. Diese Vermutung nachzuprüfen, hätte es der doppelten Versuchsdauer bedurft. Sichere Aussagen konnten mit dem beschriebenen Darmpräparat nicht gemacht werden, da

die Resorptionsraten nach 60 Min. sprunghaft hoch und niedrig liegen, was auf die gestörte Darmfunktion zurückzuführen ist.

2.5. Enzymaktivität im Nativ-Frischblatt-Extrakt

Die Versuchsergebnisse, die von verschiedenen gale-nischen Zubereitungen, als auch von den eingesetz-ten Reinsubstanzen erhalten wurden, lassen den Schluss zu, dass sowohl eine Resorptionshemmung als auch eine -förderung möglich ist. Vermutet wurde eine Abbaustufe der Flavonoltriglykoside, die als wirksames Prinzip die Alkaloid-Resorption positiv beeinflusst. Die aus dem Darminhalt nach 60 Min. Inkubationszeit isolierten Hydrolyseprodukte wur-den in eigenen Versuchsreihen erprobt, veränderten aber die Resorptionsverhältnisse des l-Hyoscyamins nicht signifikant. Die sehr unterschiedlichen Re-sorptionsraten beim Nativ-Frischblatt-Extrakt eige-ner Herstellung und beim handelsüblichen Blattextrakt liessen keine Zweifel daran, dass bei etwa gleichem Flavonol-Gehalt, - der Nativ-Frischblatt-Extrakt enthielt nur Triglykoside, beim DAB 6-Blattextrakt wurden auch Diglykoside aufgefunden, - im ersteren ein zusätzlicher, unbekannter Wirkungsmechanismus vorliegen musste.

Bei der Herstellung beider Blattextrakte wird un-terschiedlich vorgegangen. Die handelsüblichen Ex-trakte werden aus Belladonnablättern hergestellt, die nach der Ernte im frischen Zustand bis zur Trock-nung gestapelt werden und so gewisse Inhaltsstoffe einem fermentativen Abbauprozess unterliegen. Nach Abziehen der Extraktionsflüssigkeit wird den Spis-sum-Extrakten in heizbaren Exsikkatoren das rest-liche Lösungsmittel bei Temperaturen entzogen, die nicht für alle Stoffgruppen zuträglich sind. Liegen Fermente als Begleitstoffe vor, werden sie inakti-viert.

Der Nativ-Frischblatt-Extrakt wurde unter schonenden Arbeitsbedingungen hergestellt. Die frischen, in Trockeneis eingefrorenen Blätter wurden in diesem Zustand mit Methanol übergossen, extrahiert und der Spissumextrakt gefriergetrocknet. Bei diesem Vorgehen waren keine Veränderungen der Extraktinhaltsstoffe zu befürchten. Vorhandene Blattfermente behielten ihre volle Aktivität.

Ob in dem Nativ-Frischblatt-Extrakt im Gegensatz zum handelsüblichen DAB 6-Blattextrakt noch Fermentaktivität nachzuweisen war, sollte mit den nachfolgenden Versuchen geklärt werden.

In einem Brutschrank wurden folgende Lösungen 18 Stunden bei 37°C aufbewahrt:

- 1%ige Nativ-Frischblatt-Extraktlösung (wässrig),
- 1%ige Nativ-Frischblatt-Extraktlösung (50% Methanol),
- 0,01%ige Flavonoltriglykosid B-Lösung (wässrig),
- 1%ige DAB 6-Blattextrakt-Lösung (wässrig),
- Nativ-Frischblatt-Siccumextrakt.

Die Lösungen wurden anschliessend auf Polyamid-Platten chromatographiert. Wie Abb.12 zeigt, weist die Nativ-Frischblatt-Extraktlösung nach dieser Zeit eine deutliche Zone mit dem Rf-Wert des 3,3-Diglykosids auf, (s.auch Abb.10, Nr.4), während die schon vorher vorhandene Zone gleichen Rf-Werts des DAB 6-Blattextrakts sich nicht vergrösserte. Bei allen anderen Substanzen wurden keine Veränderungen festgestellt.

In der 0,01%igen Triglykosidlösung konnte selbst nach 120 Std. Stehen bei 37°C keine Hydrolyseprodukte nachgewiesen werden, weshalb man eine Autolyse der im Nativ-Frischblatt-Extrakt enthaltenen Triglykoside ausschliessen muss. Bakterien oder Pilzhypen wurden mikroskopisch nicht beobachtet.

Die vorausgegangenen Beobachtungen liessen auf die Anwesenheit von Hydrolasen schliessen, durch deren Einwirken die Flavonoltriglykoside gespalten und aktiviert wurden.

Mittels einer Enzymkinetik, in der Flavonoltriglykosid B mit einer zu etwa 50% mit β -Glucosidase* angereicherten Fraktion aus Emulsin eingesetzt wurde, konnte die Hydrolyse in vitro bewiesen werden.

2.5.1.

Aus dem Chromatogramm ist zu ersehen, dass das Triglykosid völlig in das 3,3-Diglykosid und Aglykon aufgespalten wurde. Da die eingesetzte Hydrolase und die in dem Nativ-Frischblatt-Extrakt vermutete wahrscheinlich nicht identisch sind, konnte der Versuch nur als Modell dienen.

Dennoch schien es aussichtsreich, das Modell auf den Permeationsversuch zu übertragen.

In 3,8 ml 1-Hyoscyamin-Tyrode, entsprechend 1 mg Alkaloid, wurden 2,5 mg Triglykosid A und 2,5 mg Triglykosid B gelöst. Hierzu wurden in die Injektionsspritze 0,2 ml Enzymlösung aufgezogen und sofort in den vorbereiteten Rattendünndarm infundiert. Das ausgefällte Enzym wurde vorher in 1:1000 verdünntem pH 7,0 Puffer (Merck-Puffer-Titrisol pH 7,0), gelöst. Wegen der geringen, zur Verfügung stehenden β -Glucosidasemenge besteht die Serie nur aus drei Einzelversuchen.

Von einem Anfangswert mit einer negativen Abweichung von 32% strebt die Resorptionskurve steil aufsteigend nach 30 Min. einem Maximum von 32% positiver Abweichung von den Kontrollwerten des 1-Hyoscyamins zu und erreicht nach weiteren 30 Min. flach ansteigend 45% Abweichung.

* Die β -Glucosidasefraktion wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Pfeil, Organisch-Chemisches Institut der Universität Marburg, überlassen.

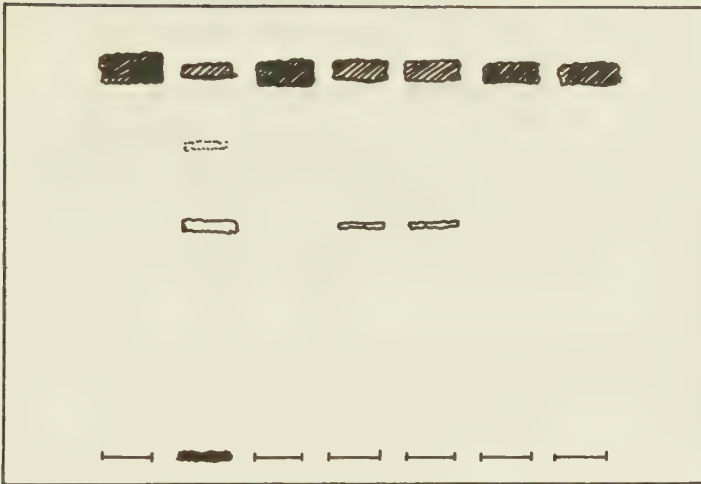


Abb. 12: Triglykoside nach 18 Std. Stehen bei 37°C im Brutschrank.

1. Nativ-Frischblatt-Extrakt
2. Nativ-Frischblatt-Extrakt-Lösung nach 18 stündigem Stehenlassen im Brutschrank bei 37°C (wässrig)
3. Nativ-Frischblatt-Extrakt-Lösung nach 18 stündigem Stehenlassen im Brutschrank bei 37°C (50% Methanol)
4. DAB 6-Blattextrakt (Trockenextrakt)
5. DAB 6-Blattextrakt-Lösung nach 18 stündigem Stehenlassen im Brutschrank bei 37°C (wässrig)
6. Nativ-Frischblatt-Siccumextrakt nach 18 stündigem Stehenlassen im Brutschrank bei 37°C
7. Flavonoltriglykosid B-Lösung nach 18 stündigem Stehenlassen im Brutschrank bei 37°C (wässrig).

2.5.2.

In gleicher Weise wurde mit einem handelsüblichen DAB 6-Extrakt verfahren, dessen Resorptionsraten innerhalb der Wahrscheinlichkeitsgrenzen des l-Hyoscyamins lägen (s. Abb. 13).

3,8 ml DAB 6-Blattextrakt-Tyrode-Lösung, entsprechend 77,5 mg Extrakt = 1 mg Alkaloid, wurden zusammen mit 0,2 ml β -Glucosidaselösung (s.o.) in der Injektionsspritze aufgezogen und sofort infundiert.

Aus Rücksicht auf die geringe Enzymmenge konnten auch in dieser Serie nur 4 Einzelversuche durchgeführt werden.

Die Resorption verläuft, wie Abb. 13 zeigt, fast parallel zur Triglykosid- β -Glucosidase-Kurve. Beide Kurven unterscheiden sich nach 30 Min. im horizontalen Schenkel signifikant von der Kontrolle.

Flavonoltriglykosid B₁

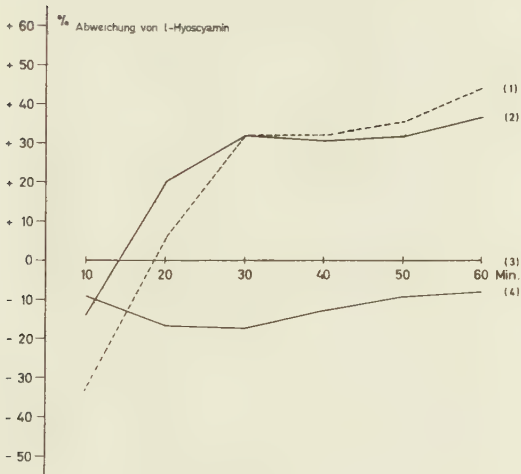
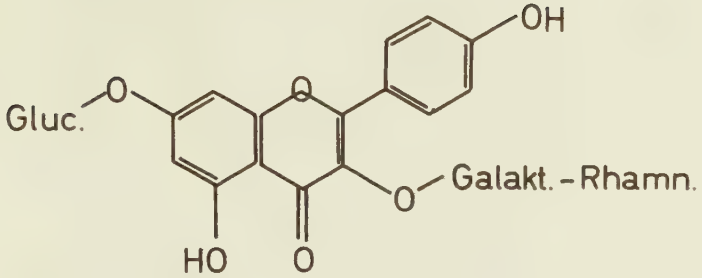


Abb. 13: 0,125% Triglykoside A + B mit β -Glucosidase-zusatz (1)
 Ext.Bell.fol.DAB 6 mit β -Glucosidasezusatz (2)
 Kontrolle: 1-Hyoscyamin (3)
 Extr.Bell.fol. DAB 6 ohne β -Glucosidase-zusatz(4)

2.6. Gehaltsbestimmung der Flavonolglykoside nach
CHRIST und MÜLLER

In den Versuchen mit Flavonoltriglykosid und B-Glucosidase wurde eine signifikante Resorptionserhöhung gegenüber dem Reinalkaloid 1-Hyoscyamin erzielt. Die Konzentration des Triglykosids betrug 0,125%. Da die Resorptionsrate des Nativ-Frischblatt noch erheblich grösser war als die bei Anwesenheit des reinen Triglykosids, wurde der Gehalt an Flavonoiden nach CHRIST und MÜLLER (41) bestimmt.

Anhand einer Eichkurve mit Rutin wurden im Nativ-Frischblatt-Extrakt, der nur Kaempferoltriglykosid B enthielt, 0,59%, im DAB 6-Blattextrakt 1,8% Gesamtflavonoide*, berechnet als Triglykosid B, ermittelt.

* Die Gesamtflavonoide des DAB 6-Blattextraktes setzen sich aus wenig Triglykosiden, mehr Diglykosiden und Aglykonen zusammen vgl. dazu HEERZ (2).

Alkaligehalt in %	129	0,02	0,125	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	8,00	16,00	32,00	64,00	128,00	256,00	512,00	1024,00	2048,00	4096,00	8192,00	16384,00	32768,00	65536,00	131072,00	262144,00	524288,00	1048576,00	2097152,00	4194304,00	8388608,00	16777216,00	33554432,00	67108864,00	134217728,00	268435456,00	536870912,00	1073741824,00	2147483648,00	4294967296,00	8589934592,00	17179869184,00	34359738368,00	68719476736,00	137438953472,00	274877906944,00	549755813888,00	1099511627776,00	2199023255552,00	4398046511104,00	8796093022208,00	17592186044416,00	35184372088832,00	70368744177664,00	140737488355328,00	281474976710656,00	562949953421312,00	1125899906842624,00	2251799813685248,00	4503599627370496,00	9007199254740992,00	18014398509481984,00	36028797018963968,00	72057594037927936,00	144115188075855872,00	288230376151711744,00	576460752303423488,00	1152921504606846976,00	2305843009213693952,00	4611686018427387904,00	9223372036854775808,00	18446744073709551616,00	36893488147419103232,00	73786976294838206464,00	147573952589676412928,00	295147905179352825856,00	590295810358705651712,00	1180591620717411303424,00	2361183241434822606848,00	4722366482869645213696,00	9444732965739290427392,00	18889465931478580854784,00	37778931862957161709568,00	75557863725914323419136,00	151115727451828646838272,00	302231454903657293676544,00	604462909807314587353088,00	1208925819614629174706176,00	2417851639229258349412352,00	4835703278458516698824704,00	9671406556917033397649408,00	19342813113834066795298816,00	38685626227668133590597632,00	77371252455336267181195264,00	154742504910672534362390528,00	309485009821345068724781056,00	618970019642690137449562112,00	1237940039285380274899124224,00	2475880078570760549798248448,00	4951760157141521099596496896,00	9903520314283042199192993792,00	19807040628566084398385987584,00	39614081257132168796771975168,00	79228162514264337593543950336,00	158456325028528675187087900672,00	316912650057057350374175801344,00	633825300114114700748351602688,00	1267650600228229401496703205376,00	2535301200456458802993406410752,00	5070602400912917605986812821504,00	10141204801825835211973625643008,00	20282409603651670423947251286016,00	40564819207303340847894502572032,00	81129638414606681695789005144064,00	162259276829213363391578010288128,00	324518553658426726783156020576256,00	649037107316853453566312041152512,00	1298074214633706907132624082305024,00	2596148429267413814265248164610048,00	5192296858534827628530496329220096,00	10384593717069655257060992658440192,00	20769187434139310514121985316880384,00	41538374868278621028243970633760768,00	83076749736557242056487941267521536,00	166153499473114484112975882535043072,00	332306998946228968225951765070086144,00	664613997892457936451903530140172288,00	1329227995784915872903807060280344576,00	2658455991569831745807614120560689152,00	5316911983139663491615228241121378304,00	10633823966279326983230456482242756608,00	21267647932558653966460912964485513216,00	42535295865117307932921825928971026432,00	85070591730234615865843651857942052864,00	170141183460469231731687303715884105728,00	340282366920938463463374607431768211456,00	680564733841876926926749214863536422912,00	1361129467683753853853498429727072845824,00	272225893536750770770699685945414569152,00	544451787073501541541399371890829138304,00	1088903574147003083082798743781658276608,00	2177807148294006166165597487563316553216,00	4355614296588012332331194975126633106432,00	8711228593176024664662389950253266212864,00	17422457186352049329324779900506532425728,00	34844914372704098658649559801013064851456,00	69689828745408197317299119602026129102912,00	139379657490816394634598239204052258205824,00	278759314981632789269196478408104516411648,00	557518629963265578538392956816209032823296,00	1115037259926531157076785913632418065646592,00	2230074519853062314153571827264836131293184,00	4460149039706124628307143654529672262586368,00	8920298079412249256614287309059344525172736,00	17840596158824498513228574618118689050345472,00	35681192317648997026457149236237378100690944,00	71362384635297994052914298472474756201381888,00	142724769270595988105828596944949512402763776,00	285449538541191976211657193889899024805527552,00	570899077082383952423314387779798049611055104,00	1141798154164767904846628775559596099222110208,00	2283596308329535809693257551119192198444220416,00	4567192616659071619386515102238384396888440832,00	9134385233318143238773030204476768793776881664,00	18268770466636286477546060408953537587553763328,00	36537540933272572955092120817907075175107526656,00	73075081866545145910184241635814150350215053312,00	146150163733090291820368483271628300700430106624,00	292300327466180583640736966543256601400860213248,00	584600654932361167281473933086513202801720426496,00	1169201309864722334562947866173026405603440852992,00	2338402619729444669125895732346052811206881705984,00	4676805239458889338251791464692105621413763411968,00	9353610478917778676503582929384211242827526823936,00	1870722095783555735300716585876842248565505364784,00	37414441915671114706014331717536844971311007295568,00	7482888383134222941202866343507368994262201459104,00	14965776766268445882405732687014737988524402918208,00	29931553532536891764811465374029475977048805836416,00	59863107065073783529622930748058951954097611672832,00	119726214130147567059245861496117903908195223345664,00	2394524282602951341184917229922358078163904466912,00	4789048565205902682369834459844716156327808933824,00	9578097130411805364739668919689432312655617867648,00	19156194260823610729479337839378864625311235335296,00	38312388521647221458958675678757729250622470670592,00	76624777043294442917917351357515458501244941341184,00	153249554086588885835834702715030917002489882682368,00	306499108173177771671669405430061836004979765364736,00	612998216346355543343338810860123672009959530729472,00	1225996432692711086686677621720247344019919061458944,00	2451992865385422173373355243440494688039838122917888,00	4903985730770844346746710486880989376079676245835776,00	9807971461541688693493420973761978752159352491671552,00	1961594292308337738698684194752395750431870492334304,00	3923188584616675477397368389504791500863740884668608,00	7846377169233350954794736779009583001727481769337216,00	1569275433846670190958947355801916600345493537867424,00	3138550867693340381917894711603833200690987075734848,00	6277101735386680763835789423207666401381974151469696,00	1255420347077336152767157884641533280276394830293888,00	2510840694154672305534315769283066560552789660587776,00	5021681388309344611068631538566133121105579321175552,00	1004336277661868922213726307713226242211115844231104,00	2008672555323737844427452615426452484422231688462208,00	4017345110647475688854905230852904968844463764924416,00	8034690221294951377709810461705809937688927529848832,00	160693804425899027554196209234116198753778550596976,00	321387608851798055108392418468232397507557101193952,00	642775217703596110216784836936464795015114202387904,00	1285550435407192220433569673872929590030228404775808,00	2571100870814384440867139347745859180060456809551616,00	5142201741628768881734278695491718360120913619103232,00	10284403483257537763468557390983436720241827238206464,00	205688069665150755269371147819668734404836544764128,00	41137613933030151053874229563933746880967308952825728,00	8227522786606030210774845912786749376193461790565152,00	16455045573212060421549691825573498752386923581130304,00	32910091146424120843099383651146997504773847162260608,00	65820182292848241686198767302293995009547694324521216,00	13164036458569648337239753460458799001909528849044224,00	26328072917139296674479506920917598003819057698088448,00	52656145834278593348959013841835196007638115396177984,00	105312291668577186897918027683670392015276230792355968,00	210624583337154373795836055367340784030552461584711936,00	421249166674308747591672110734681568061104923169423872,00	842498333348617495183344221469363136122209846338847744,00	16849966666972349903666884429387262722444176776776896,00	33699933333944699807333768858774525444888353553553792,00	67399866667889399614667537717549050889776707107111584,00	134799733335778799229335075435098101779553414214222784,00	269599466671557598458670150870196203559106828284445568,00	539198933343115196917340301740392407118213656568891136,00	107839786668623039383468060348078481423647313113778272,00	215679573337246078766936120696156962847294626227556544,00	431359146674492157533872241392313925694589252455113088,00	862718293348984315067744482784627813889178504910227168,00	1725436586697968630135488965569255627778357009820454336,00	34508731733959372602709779311385112555567140196409072,00	69017463467918745205419558622770225111134283380378144,00	138034926935837490410839117245540450222268566760756288,00	276069853871674980821678234491080904444537333521512576,00	552139707743349961643356468982160808889064667043025152,00	1104279415486699923286712937964321617778129334086050304,00	2208558830973399846573425875928643235556258668172100608,00	4417117661946799693146851751857286471112517336344201216,00	88342353238935993862937035037145729422250346726884224,00	1766847064778719877258740700742914588445006934533768448,00	353369412955743975451748140148582917769001386867536896,00	706738825911487950903496280297165835378002773735073792,00	1413477651822975901806992560594331670756005474670147584,00	282695530364595180361398512118866334151201094934029504,00	565391060729190360722797024237732668302402189868059008,00	1130782121458380721445594048475465336604804379736118016,00	226156424291676144289118809695093067320960875947223632,00	452312848583352288578237619390186134641921751894444664,00	904625697166704577156475238780372269283843503788888896,00	1809251394333409154312950477560744538567687007577777792,00	3618502788666818308625900955121489077135374015155555584,00	7237005577333636617251801910242978154270748030311111168,00	144740111546672732345036038204859563085414800606222336,00	289480223093345464690072076409719126170829601212444672,00	57896044618669092938014415281943825234165800242489144,00	11579208923733818587602883056388765046832160048497888,00	23158417847467637175205766112777530093664320096995776,00	46316835694935274350411532225555060187328640193991552,00	9263367138987054870082306445111012037465728387998304,00	18526734277974109740164612890222024074931457759996608,00	37053468555948219480329225780444048149862915519993216,00	74106937111896438960658451560888096299725831039986432,00	14821387422379287792131690312177619955945166107996864,00	29642774844758575584263380624355239911891332215993728,00	59285549689517151168526761248710479823782664431987456,00	11857109937903430233705352249742095964756532886397504,00	23714219875806860467410704499484191929513065772795008,00	47428439751613720934821408998968373859026131545590016,00	94856879503227441869642817997936747718052263091188032,00	189713759006454883739285635995873495436104526182366064,00	379427518012909767478571271991746990872209052364732128,00	758855036025819534957142543983493917744418104728464256,00	1517710072051639069914250879966987835488836209456928512,00	303542014410327813982850175993397567097767411891384512,00	607084028820655627965700351986795134195534823782769024,00	121416805764131125593140070397359026839106947565538176,00	24283361152826
-------------------	-----	------	-------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	---------	---------	---------	---------	----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------	-------------	-------------	-------------	--------------	--------------	--------------	---------------	---------------	---------------	---------------	----------------	----------------	----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------	--------------------	--------------------	--------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------	----------------------	----------------------	----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	--	--	--	--	---	---	---	--	--	--	---	---	---	---	--	--	--	---	--	--	---	---	---	---	--	--	--	---	---	---	--	--	--	--	---	---	---	--	--	--	---	---	---	---	--	--	--	---	---	---	--	--	--	--	--	---	--	---	---	---	--	--	--	--	---	---	---	--	--	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--	--	--	---	---	---	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	---	---	---	---	--	--	--	---	---	---	---	---	---	---	--	--	--	---	---	---	--	--	--	--	--	---	---	--	---	---	--	---	---	---	--	--	--	---	---	--	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---	---	--	---	---	---	----------------

3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Tollkirschenextrakt als galenische Zubereitung anders wirkt als l-Hyoscyamin. Die Resorption, die hier untersucht wurde, kann von den Begleitstoffen fördernd oder hemmend beeinflusst werden. Im Beispiel der Belladonnaextrakte zeigt sich ein eklatanter Unterschied zwischen der Resorptionsrate des l-Hyoscyamins, einem Nativ-Frischblatt-Extrakt, einem Blatt-Extrakt nach DAB 6 und einem handelsüblichen Wurzel-Extrakt.

Schon die unverhältnismässig grosse Streuung in der Versuchsreihe des Nativ-Frischblatt-Extraktes lässt auf einen uneinheitlichen Reaktionsablauf in der infundierten Extraktlösung schliessen (Fermentmangel). Ob sich die Streuung durch Fermentzugabe verringern lässt, wurde nicht geprüft, ist jedoch zu vermuten, da in den Reihen mit Triglykosiden A + B und β -Glucosidase und DAB 6-Blatt-Extrakt und β -Glucosidase sehr günstige Streuungen erhalten wurden.

Die auffallend hohen Resorptionswerte des Nativ-Frischblatt-Extraktes sind auf die Anwesenheit der Flavonoltriglykoside und intakter, genuiner Glucosidasen zurückzuführen.

Da bei der Herstellung der Blattextrakte nach DAB 6 die natürlichen Fermente denaturiert werden, kommt die alkaloidfällende Wirkung der vorhandenen Gerbstoffe zur Geltung. In Modellversuchen konnte die resorptionsverzögernde Wirkung der Gerbstoffe bewiesen werden. - Demnach bietet auch der Blatt-Extrakt, wie ihn das Deutsche Arzneibuch fordert, gegenüber dem Wurzel-Extrakt keine Vorteile.

Reinsubstanzen, (Diglykoside, Aglykone und deren Ammoniumsalze) die als hydrolytische Folgeprodukte der Flavonoltriglykoside zu sehen sind, erwiesen sich

als resorptionsfördernd, obgleich die erhaltenen Abweichungen von den l-Hyoscyaminwerten nicht in allen Fällen statistisch gesichert sind.

Die volle Resorptionsleistung des Darmes wird nach 30 Min. Inkubationszeit erreicht. Während dieses Zeitabschnittes wird besonders bei den gut wasserlöslichen Substanzen ein steiler Resorptionsanstieg beobachtet, wobei der Anfangswert meist unter den Werten der reinen l-Hyoscyaminlösung zurückbleibt.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Galenische Zubereitungen wirken anders als Reinsubstanzen in Bezug auf die Alkaloidresorption. Bei gerbstoffhaltigen Belladonna Blatt- und Wurzelextraktlösungen wurde gegenüber reinen l-Hyoscyaminlösungen eine verminderte Resorptionsrate, aus Flavonolglykosid- und Flavonolaglykonlösungen eine geringfügig erhöhte Resorptionsrate registriert. Mit einem Belladonna-Blattextrakt besonderer Herstellung wurde eine Mehrresorption von etwa 80-100% erzielt, was auf die Resorptionsvermittlung genuiner Flavonoltriglykoside und deren Abbau durch Hydrolasen zurückzuführen ist.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. Bestimmung des Alkaloidgehaltes in Belladonna-
Extrakten nach dem Monographie-Entwurf zum
DAB 7-BRD

3 g Tollkirschenextrakt, bis zur 3. Dezimale des Grammgewichts gewogen, werden in 5 ml Wasser möglichst vollständig gelöst und der Lösung 30,0 g Aether (peroxidfrei) und 2,0 ml 6 n Ammoniakflüssigkeit zugefügt. Die Mischung wird unter gelegentlichem Kühlen in Eiswasser 15 Min. kräftig geschüttelt. Nach Zusatz von 1,0 g gepulvertem Tragant wird bis zur Klärung des Aethers geschüttelt. Man giesst dann von der Aetherlösung soviel wie möglich durch wenig Watte in ein tariertes Kölbchen mit Schliffstopfen und wiegt auf 1 Dezimale des Grammgewichts (= a). Anschliessend destilliert man den Aether bis auf etwa 3 ml ab, fügt zum Rest 3 ml Wasser sowie 5 ml 0,1 n Salzsäure hinzu und erwärmt die Mischung bis zum Verschwinden des Aethergeruches auf dem Wasserbad. Die saure Lösung filtriert man in einen Scheidetrichter und spült Kölbchen und Filter dreimal mit je 5 ml Wasser nach. Die saure Lösung wird nun dreimal mit je 20 ml Aether (peroxidfrei) ausgeschüttelt. Die Aetherausschüttelung sammelt man in einem zweiten Scheidetrichter und gibt nach kurzem Stehen den abgeschiedenen, wässrigen Anteil zur sauren Lösung zurück. Die saure Lösung wird mit 6 n Ammoniakflüssigkeit bis zur deutlichen alkalischen Reaktion versetzt und dreimal mit je 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Ausschüttelungen werden auf dem Wasserbad eingedampft und der Rückstand bis zum Verschwinden des Chloroformgeruchs erwärmt. Den Rückstand löst man in 1 ml neutralisierten Aethanols und gibt 5,00 ml 0,1 n Salzsäure, 10 ml frisch aufgekochten und wieder erkalten Wassers sowie 1 Tropfen Methylrotlösung hinzu und

titriert mit 0,1 n Natronlauge zurück.

1 ml 0,1 n HCl entspricht 0,02892 g Alkaloiden,
berechnet als Hyoscyamin.

Der Alkaloidgehalt des Extraktes berechnet sich nach

$$\text{Gehalt} = \frac{n \cdot 0,02892 \cdot 1000}{a} = \%$$

wobei n die Anzahl Milliliter verbrauchter 0,1 n
Salzsäure und a die Anzahl Gramm des abgegossenen
Aetherauszugs bedeutet.

5.2. Tyrodellösung

NaCl	8,0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,947 g
KH ₂ PO ₄	0,181 g
Glucose	3,0 g
Aq. dest. ad	1000 ml

Die Lösung weist gegenüber reinem Wasser eine Gefrier-
punktserniedrigung von = 0,58°C auf.

5.3. Vorbereitung des isolierten Rattendünndarms

Eine weibliche, weisse, ca. 300-350 g schwere Wistar-
Ratte, Stamm FW 49 Biberach, wurde durch Nackenschlag
getötet und der Bauchraum durch Mittelschnitt eröffnet.
Nach Entfernen des Mesenteriums wurden die Darmabschnit-
te Ileum und z.T. Jejunum, etwa 3 cm vor dem Caecum be-
gonnen, 25-30 cm lang abgemessen und entnommen. Der
Dünndarm wurde sofort in Tyrodellösung von 37°C ein-
gelegt und der Darminhalt vorsichtig herausgespült. Das
Gewicht des so behandelten Darmes betrug 3,0-3,5 g.
Anschliessend wurde nach Abklemmen des einen Endes die
Probelösung infundiert und das andere Darmende eben-
falls abgeklemmt. Die Präparationszeit bis zum Ein-
hängen des gefüllten Darmes in das Inkubationsgefäss

betrug bei allen Versuchen einheitlich 20 Min. Während einer Stunde wurde im Abstand von 10 Min. jeweils die gesamte Bad-Tyrode (20 ml) abgelassen und durch die gleiche Menge frischer Tyrodelösung ersetzt.

5.4. Gehaltsbestimmung nach HÄUSSLER

Die nach je 10 Min. Inkubationsdauer abgezogene Bad-Tyrode (20 ml) wurde mit 1 ml Natriumacetatpuffer pH 4,6 auf denselben pH-Wert eingestellt. Hinzugefügt wurden 2 ml frischbereitete, kalt gesättigte Tropäolin-00-Lösung, 18 ml frisch destilliertes Chloroform und in einem Scheidetrichter 15 Min. kräftig geschüttelt. Die gesamte Flüssigkeit wurde in ein Zentrifugenglas abgelassen, der Scheidetrichter mit 2,0 ml Chloroform nachgespült. Die vereinigten Flüssigkeiten wurden unter Verschluss 10 Min. bei 1700 g zentrifugiert, in den Scheidetrichter so vorsichtig eingegossen, dass sich keine Emulsion an der Grenzfläche beider Phasen bildete, die Alkaloid-Tropäolin-00-Chloroform-Lösung in ein Zentrifugenglas abgetrennt und unter Verschluss 30 Min. bei 1700 g zentrifugiert. 18 ml dieser Lösung wurden unter Vermeiden der am Glasrand haftenden Wassertropfen abpipettiert und mit Säurereagens auf 20 ml im Meßköbchen aufgefüllt. Die amethystfarbenen Proben wurden nach 24 stündigem Stehen unter Lichtabschluss bei 545 nm gegen reines Chloroform als Vergleichsprobe gemessen ($d = 1 \text{ cm}$).

Säurereagens: 1 ml konzentrierte Schwefelsäure/100 ml Methanol.

5.5. Lösungstyrode für Nativ-Frischblatt-Extrakt

NaCl	2,20 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,20 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,10 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,366 g
KH ₂ PO ₄	0,07 g
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	1,550 g
Glucose	3,00 g
Aq. dest. ad	1000 ml

5.6. Nativ-Frischblatt-Extrakt-Infusionslösung

775 mg Nativ-Frischblatt-Extrakt wurden in 40 ml Lösungstyrode (s.5.5.) gelöst und unter Zugabe des tertiären Phosphats auf pH 7,3 eingestellt.

$$\Delta t = 0,56^{\circ}\text{C}.$$

5.7. Lösungstyrode für handelsüblichen Wurzelextrakt

NaCl	4,8 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,476 g
Na ₃ HPO ₄ .12H ₂ O	1,25 g
KH ₂ PO ₄	0,09 g
Glucose	3,0 g
Aq. dest. ad	1000 ml

5.8. Wurzelextrakt-Infusionslösung

775 mg Wurzelextrakt wurden in 40 ml Lösungstyrode (s.5.7.) gelöst und unter Zugabe des tertiären Natriumphosphats auf den pH-Wert 7,3 eingestellt.

$$\Delta t = 0,57^{\circ}\text{C}.$$

5.9. Hautpulvermethode nach SCHRÖDER

100 ml eines Drogenauszuges (= 1 g Droge), - in unserem Fall wurden 150 mg Trockenextrakt verwendet, - werden in einer Platinschale zur Trockne eingedampft, der Rückstand bei 100°C bis zum konstanten Gewicht getrocknet und gewogen: Gesamtgewicht der löslichen Stoffe (G). Hierauf verascht man diesen Verdampfungsrückstand und ermittelt die Aschemenge (A). G minus A ergibt die Menge der gelösten, organischen Stoffe in 100 ml Drogenauszug (O).

Sodann behandelt man 200 ml der gerbstoffhaltigen Lösung eine Stunde lang mit 10 g Hautpulver unter häufigem Umschütteln, presst die Masse mit einem Leinenfilter ab und behandelt das Filtrat nochmals 24 Std. mit 4 g Hautpulver. Von der filtrierten Flüssigkeit werden hierauf 100 ml auf dem Wasserbad eingedampft, der Rückstand bei 100°C getrocknet und gewogen. Als dann verascht man ihn und subtrahiert davon das Gewicht der Asche. Auf diese Weise ergibt sich das Gewicht d der in 100 ml Drogenauszug enthaltenen Nichtgerbstoffe (N). Hiervon ist jedoch noch die geringe Menge der aus dem Hautpulver gelösten, organischen Stoffe, die durch einen direkten unter den gleichen Bedingungen auszuführenden Versuch zu ermitteln ist, in Abzug zu bringen. Die Menge des in 100 ml Drogenauszug (= 0,150 g Extrakt) enthaltenen Gerbstoffe ergibt sich schliesslich aus O-N.

5.10. Kupferacetat-Methode nach LINDE und TEUFER

100 ml Drogenauszug (entsprechend 0,150 g Trockenextrakt) werden auf dem Wasserbad auf 50 ml eingengt und, falls die Droge Gallussäure enthält, mehrmals mit Aether ausgeschüttelt. Zu der Aether enthaltenden, wässrigen Flüssigkeit wird Weingeist gegeben, solange noch ein Niederschlag entsteht, um vorhandene Pektine auszufällen, filtriert, das Filtrat mit Weingeist gut nachgewaschen und das Filtrat bis

bis zur Entfernung des Aethers und Weingeists eingengt. Dann wird mit 4%iger, neutraler Kupferacetat-Lösung in geringem Überschuss versetzt, das ausgefällte Kupfertannat auf einem vorher getrockneten und gewogenen Filter von bekanntem Aschegehalt gesammelt, bis zur Entfernung des überschüssigen Kupferacetats nachgewaschen (Ferrocyankali-Reaktion), bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Schliesslich verascht man das Filter selbst, behandelt den Rückstand mit zwei Tropfen rauchender Salpetersäure und glüht nach dem Trocknen erneut. Die Menge des so erhaltenen Kupferoxids wird von der Menge Kupfertannat in Abzug gebracht, woraus sich der Gerbstoffgehalt in 0,150 g Trockenextrakt ergibt.

5.11. Gerbstoffbestimmung mit PbCl_2

Von einer 0,02%igen Tannin"Merck"-Lösung wurden 1-5 ml in 20 ml Meßkölbchen pipettiert, mit Wasser verdünnt und mit 2 ml 0,5%iger PbCl_2 -Lösung auf 20 ml aufgefüllt. Nach 20 Min. Stehen bei Zimmertemperatur wurde die Transmission der opaleszierenden Lösung im Spektralphotometer bei 400 nm ($d = 2$ cm) gemessen.

5.12. Wurzelextrakt "gerbstofffrei"-Infusionslösung

685 mg Wurzelextrakt "gerbstofffrei" wurden in 40 ml Lösungstyrode (s.5.13.) gelöst und unter Zugabe von 0,025 mg $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ auf den pH-Wert 7,3 gebracht.
 $\Delta t = 0,56^\circ\text{C}$.

5.13. Lösungstyrode für Wurzelextrakt "gerbstofffrei"

NaCl	5,46 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,20 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,710 g
KH ₂ PO ₄	0,136 g
Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O	0,625 g
Glucose	3,00 g
Aq. dest. ad	1000 ml

5.14. DAB 6-Blattextrakt-Infusionslösung

1,550 g DAB 6-Blattextrakt wurde in 80 ml Lösungstyrode (s.5.15.) gelöst und mit 0,082 g Na₃PO₄·12H₂O auf pH 7,3 eingestellt.

$\Delta t = 0,56^{\circ}\text{C}.$

5.15. Lösungstyrode für DAB 6-Blattextrakt

NaCl	4,38 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,20 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10 g
KCl	0,20 g
Na ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,560 g
KH ₂ PO ₄	0,106 g
Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O	1,025 g
Glucose	3,00 g
Aq. dest. ad	1000 ml

5.16. Isolierung der Flavonoltriglykoside A + B

Ein Chromatographierrohr von 9 cm lichter Weite und 230 cm Länge wurde mit Polyamidpulver "Woelm" zur Chromatographie gefüllt, mit Methanol und Wasser bis zum klaren Ablauf der Waschflüssigkeit gewaschen, diese durch das Fließmittel (Wasser, Spiritus, Methyläthylketon, Acetylaceton = 65:15:10:5) ersetzt und der lyophilisierte Methanolextrakt, gelöst in dem-

selben Fliessmittel, aufgetragen. Eluationsdauer etwa 48 Std.

5.16.1.

Reindarstellung der Triglykoside A + B

Die Triglykosid-Fraktion der Säule wurde auf Cellulose-Schicht-Platten mittels eines elektromechanischen Auftragegerätes strichförmig aufgesprüht, (etwa 250 mg Substanz/Celluloseplatte 20x20 cm), und in dem Fliessmittel Aethylacetat, Ameisensäure, Wasser = 10:2:3 mehrfach aufsteigend entwickelt.

Die mit Wasser aus der Cellulose in einem ALLIHNschen Rohr extrahierten Triglykoside wurden erneut auf Cellulose-Platten (20x80 cm) aufsteigend rechromatographiert. Das verwendete Fliessmittel war n-Propanol, Ameisensäure, Wasser = 3:4:2. Die bei 366 nm dunkel absorbierenden Zonen wurden abgetrennt und die Triglykoside nach Einfüllen der Cellulose in das ALLIHNsche Rohr mit Wasser extrahiert, geringe Mengen gelöster Cellulose mit Methanol gefällt und abzentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde bei 40°C am Rotationsverdampfer abgezogen.

5.17. Herstellung der Cellulose-Schicht-Platten

80 g Cellulose-Pulver MN 300 (Macherey und Nagel) wurden in 600 ml Wasser 3 Min. mit dem Ultra Turrax (Janke und Kunkel) homogenisiert und davon 10 Cellulose-Platten 20x20 cm mit der Hand gegossen. Nach Abtrocknen wurden die Platten 30 Min. bei 105°C aktiviert.

5.18. Quantitative Bestimmung der Flavonolglykoside in Belladonnaextrakten nach CHRIST und MÜLLER

50 mg eines Belladonna-Trockenextraktes, genau gewogen, wurden in einem 100-ml-Rundkolben mit 20 ml Aceton und 2 ml Salzsäure (25%ig) versetzt und 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Das Hydrolysat wurde durch Watte in einen 100-ml-Meßkolben filtriert und nach

Zusatz von 20 ml Aceton 10 Min. gekocht. Diese Lösung wird ebenfalls durch Watte in den Meßkolben filtriert und die Acetonextraktion noch einmal wiederholt. Der Meßkolben wird mit Aceton bis zur Marke aufgefüllt. 20 ml des Hydrolysats pipettiert man in einen Scheidetrichter, gibt 20 ml Wasser zu und schüttelt einmal mit 15 und weitere dreimal mit je 10 ml Aethylacetat aus. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit 40 ml Wasser gewaschen, durch Watte in einen Meßkolben filtriert und mit Aethylacetat bis zur Marke aufgefüllt.

Je 10 ml dieser Lösung werden in zwei 25-ml-Meßkölbchen pipettiert und 0,5 ml einer 0,5%igen wässrigen Natriumcitratlösung zugesetzt. (Bei Anwesenheit von Flavanolen wird deren Extinktion durch Natriumcitrat völlig gelöscht.) In das eine Meßkölbchen gibt man 2 ml Aluminiumchloridlösung und füllt beide mit Methanol-Eisessig bis zur Marke auf. Nach 45 Min. wird die Extinktion der mit AlCl_3 versetzten Lösung bei 425 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gegen die Vergleichslösung ohne AlCl_3 gemessen.

Der Gehalt wurde anhand einer Eichkurve ermittelt, die mit reinem Rutin. $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ unter den Versuchsbedingungen aufgestellt wurde.

Nach Angabe der Verfasser berechnet sich der Flavonolgehalt, bezogen auf Quercetin, nach:

$$\% \text{ Flavonolderivat bzw. Quercetin} = \frac{E \cdot 0,735}{\text{Einwaage in g}}$$

E = gemessene Extinktion

Reagentien:

Aceton DAB 6

Salzsäure 25%ig DAB 6

Aethylacetat Erg. Bd.6

Aluminiumchloridlösung: 2 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /100 ml Methanol-Eisessig

Methanol-Eisessig: 50 ml Eisessig DAB 6 werden mit Methanol Erg. Bd.6 auf 1000 ml aufgefüllt.

- 5.19. Den statistischen Berechnungen liegt der t-Test nach STUDENT (45) (46) (48) zugrunde.
- 5.20. Berechnung der Blut-Isotonie bei den eingesetzten Infusionslösungen nach Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis (47).

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. NATTERMANN, A. u. Cie : Die Phytotherapeutische Welt, 29 (1962)
2. HEERZ, T. : Dissertation, Marburg 1965
3. KÜSSNER, W. : Merck's Jber., 52, 39 (1938)
4. ROTHLIN, E. : Schweiz.med.Wschr. 54, 1101 (1924)
5. LAUBENDER, W. u. BALLMAIER, H. : Arzneimittel-Forsch., 15, 905 (1965)
6. SCHLEMMER, F. : Pharmaz. Ind., 24, 466 (1952)
7. PANEGROSSI, G. : Dtsch.med.Wschr., 64, 699 (1938)
8. v. WITZLEBEN, H.D. : Dtsch.med.Wschr., 64, 671 (1938)
9. KREITMAIR, H. : Merck's Jber., 52, 46 (1938)
10. DIBBERN, H.W. : Arzneimittel-Forsch., 16, 177 (1966)
11. DIBBERN, H.W. : Arzneimittel-Forsch., 16, 1304 (1966)
12. HOGBEN, C.A.M., D.J. TOCCO, B.B. BRODIE u. L.S. SCHANKER : J. Pharmacol.exp.Therapeut., 125, 275 (1959)
13. SCHANKER, L.S. : J. Pharmacol.exp.Therapeut., 126, 283 (1959)
14. SCHANKER, L.S. : J. Pharmacol.exp.Therapeut., 128, 115 (1960)
15. DETTLI, L. u. P. SPRING : Pharmaz. Ztg., 109, 1055 (1964)
16. TRAVELL, J. : Ann.N.Y. Acad. Sci., 90, 13 (1960)

17. MILNE, M.D., : Amer. J.med. Sci., 24,
B.H. SCRIBNER u. 709 (1958)
M.A. CRAWFORD
18. STAUBESAND, J. : Pharmaz. Ztg. 109, 1130
(1964)
19. CUSHNY : J. Physiology 30, 176
(1904)
20. MAGNUS, R. : Pflügers Arch.ges.Physiol.
Menschen, Tiere 108, 1
(1905)
21. NEUKIRCH, P. : Pflügers Arch.ges.Physiol.,
Menschen, Tiere 147, 153
(1912)
22. TRENDLENBURG, P. : Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.
Pathol. Pharmakol., 81, 55
(1917)
23. LE HEUX, J.W. : Pflügers Arch.ges.Physiol.
Menschen, Tiere 173, 8
(1919)
24. LE HEUX, J.W. : Pflügers Arch.ges.Physiol.
Menschen, Tiere 179, 177
(1920)
25. ROTHLIN, E. : Pflügers Arch.ges.Physiol.
Menschen, Tiere 206, 614
(1924)
26. PULEWKA, P. : Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.
Pathol. Pharmakol., 168, 307
(1932)
27. PULEWKA, P. : Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.
Pathol. Pharmakol., 180, 119
(1936)
28. FLEISCHMANN, P. : Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.
Pathol. Pharmakol., 62, 518
(1910)
29. WERNER, G. : Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.
Pathol. Pharmakol., 251, 320
(1965)
30. CRONHEIM u. WARE : J. Pharmacol.exp.Therapeut.,
92, 89 (1948)

31. EL DARAWAY, Z.J., : Analyst 81, 601 (1956)
S.L. TOMPSETT,
C.W. BALLARD u.
J. ISAACS
32. HÄUSSLER, A. : Dtsch. Apotheker-Ztg., 97,
730 (1957)
33. FIEDLER, U. u. : Arzneimittel-Forsch., 4,
G. HILDEBRAND 426 (1954)
34. HENSCHLER, D. u. : Dtsch.med.Wschr., 91, 2241
P. KREUTZER (1966)
35. SCHMID, W. : Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.
Pathol. Pharmacol., 184,
93 (1937)
36. KRIEGER, G. : Dtsch. Apotheker-Ztg., 92,
849 (1952)
37. SOOS, E. : Scientia pharmac., 15, 42
(1947)
38. ROETTGERS, H. : Lehrbuch der Nahrungsmittel-
chemie, Bd. 2, S. 1385 (1926)
39. PETER, H. : Arzneimittel-Forsch.,
G. FISEL u. 16, 719 (1966)
W. WEISER
40. VOGEL, G. u. : Arzneimittel-Forsch.,
H. STRÖCKER 16, 1630 (1966)
41. CHRIST, B. u. : Arch. Pharmaz. Ber. dtsch.
K.H. MÜLLER pharmaz. Ges., 293/65, 1033
(1960)
42. HUBACEC, J. u. : Coll. Czech.chem. Comen.,
U. TROJNA 29, 1259 (1964)
43. LIST, P.H. u. : Arch. Pharmaz. Ber. dtsch.
S. HANAFI pharmaz. Ges. 298/70, 107
(1965)
44. STEINEGGER, E. u. : Pharmac. Acta Helvetiae,
D. SONANINI 41, 670 (1966)
45. THER, L. : Grundlagen der experimentellen
Arzneimittelforschung, Wiss.
Verlagsgesellschaft m.b.H.,
Stuttgart 1965

46. KUESTER, THIEL, : Logarithmische Rechentafeln,
FISCHBECK Walter de Gruyter u. Co.,
Berlin 1958, S. 190
47. HAGERS HANDBUCH DER : Ergänzungsband II
PHARMAZEUT. PRAXIS Berlin/Göttingen/Heidelberg:
Springer 1958, S. 109
48. DUCUMENTA GEIGY : Herausgeber: J.R. Geigy A.G.
Wissenschaftliche Pharmazeutische Abteilung,
Tabellen 6. Auflage 1960, S. 32

LEBENS LAUF

Am 8. Mai 1937 wurde ich als Sohn der Eheleute Heinrich Franz Weil und Anna Weil, geb. Sulzbach, in Oppershofen, Kreis Friedberg/Hessen, geboren. Vom Herbst 1944 bis März 1949 besuchte ich die dortige Volksschule, anschliessend das Ernst-Ludwig-Realgymnasium in Bad Nauheim, wo ich im März 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Die zweijährige Lehrzeit als Apothekerpraktikant absolvierte ich in der Central-Apotheke in Bad Nauheim, die mit dem pharmazeutischen Vorexamen am 30. März 1960 in Darmstadt beendet wurde. Im Sommersemester desselben Jahres begann ich mit dem Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen, das ich nach einem Wechsel des Studienortes in Marburg/Lahn fortsetzte und am 12. Oktober 1963 mit dem Pharmazeutischen Staatsexamen abschloss.

Nach einer kurzen Vertretungszeit in der Stern-Apotheke in Butzbach kehrte ich nach Marburg zurück und wurde am 1. Januar 1964 wissenschaftlicher Angestellter am Pharmakologischen Institut, wo ich mich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Schmid mit analytischen Problemen beschäftigte.

Im Oktober 1964 begann ich mit der Anfertigung einer Dissertationsarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P.H. List, die ich im April 1967 beendete.

